

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Peroxid vodíku a abiotická tvorba chlorovaných organických látek v lesní půdě

**Hydrogen peroxide and the abiotic formation of chlorinated
organic compounds in forest soil**

Diplomová práce oboru Chemie životního prostředí

Praha 2009

Jana Doležalová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Dr. Sándora Forczeka PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....
podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří se přímo i nepřímo podíleli na vypracování této diplomové práce a pomohli mi tak ke zdárnému dokončení – zejména svému školiteli Dr. Sándoru Forczekovi, PhD. a Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc.

Abstrakt

Peroxid vodíku je přirozenou součástí lesní půdy a vzniká především díky činnosti různých půdních organismů jako jsou houby rozkládající dřevo a mykorrhizní houby. Peroxid vodíku se v půdě účastní abiotické chlorace organických látek. Tato chlorace probíhá pravděpodobně pomocí Fentonové reakce: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$. Vznikající hydroxylové radikály jsou schopny oxidovat chlorid na reaktivní HOCl a následně může proběhnout chlorace organických látek a vytváří se tak různé chlorované uhlovodíky. K měření H_2O_2 lze použít řady analytických optických, elektroanalytických či chromatografických metod. Cílem této práce byla optimalizace spektrofotometrické metody za použití xylenové oranže při stanovení H_2O_2 v lesní půdě. Tato metoda je spolehlivá, přístojově nenáročná, čas analýzy poměrně krátký. Metoda je vhodná k měření nízkých koncentrací hydroperoxidů ve vodě, ale pro půdní vzorky prozatím nebyla použita. Protože je matricí při této analýze půda, je vhodné užití metody standardního přídatku. Pro stanovení koncentrace z půdy byla přezkoušena také různá extrakční činidla, kdy se jako nejvhodnější ukázal aceton. Limit detekce peroxidu je $0,29 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy ($n=8$) a metoda je lineární až do hodnot $10 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy při čemž množství peroxidu v čerstvých jarních vzorcích půdy se pohybovalo od 2,5 do $9,0 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy.

Abstract

Hydrogen peroxide is a natural component of forest soil and is formed especially by the activity of different soil organisms as rot fungi and mycorrhizal fungi. Hydrogen peroxide takes part in abiotic chlorination of soil organic substances. This chlorination process is most likely proceeds according to the Fenton's reaction: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$. Hydroxylic radicals formed by Fenton's reaction can oxidize chloride to HOCl which can chlorinate soil organic matter. This way, various chlorinated hydrocarbons are formed. There are many optical, electroanalytical and chromatographic methods to measure H_2O_2 . The aim of this work was to optimize the method of H_2O_2 measurement in forest soil by xylenol orange. This method is very promising, undemanding to instruments and giving solid analytical result in relatively short time. This method is suitable to measure low concentrations of hydroperoxides in water; it have not been used, however, for soil samples. As the matrix of this analysis is soil, it is suitable to use the method of standard addition. To determine various extraction agents, it has been found, that this method gave the best results when acetone was applied as extraction agent. The limit of detection of hydrogen peroxide was $0.29 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ soil ($n=8$), method was linear to $10 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ soil and amount of hydrogen peroxide was from 2.5 to $9.0 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ soil in fresh spring samples.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	9
2.1 Zdroje H_2O_2	9
2.1.1 Houby produkující peroxid vodíku	9
2.1.2 Bakterie produkující peroxid vodíku	11
2.1.3 Atmosférická depozice peroxidu vodíku	11
2.2 Rozklad peroxidu v půdě	12
2.3 Chlorované organické látky	14
2.4 Kyselina trichloroctová	16
2.5 Stanovení H_2O_2	20
2.5.1 Jodometrické stanovení zásobního roztoku peroxidu vodíku	20
2.5.2 Stanovení peroxidu pomocí xylenové oranže (metoda podle Wolffa) ..	20
2.5.3 Stanovení peroxidu pomocí toluidinové modři.....	22
2.6 Stanovení železa pomocí fenanthrolinu	22
2.7 Spektrofotometrie	23
2.8 Stanovení TCA a plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu.....	24
3. Experimentální část.....	26
3.1 Použité chemikálie.....	26
3.2 Použité pomůcky a přístroje	27
3.3 Odběr a úprava vzorků půdy	27
3.3.1 Odběr vzorků půdy	27
3.3.2 Odběrové lokality	28
3.3.3 Úprava a skladování vzorků půdy	28

3.4	<i>Pracovní postup</i>	29
3.4.1	<i>Stanovení H_2O_2</i>	29
3.4.1.1	Jodometrické stanovení zásobního roztoku peroxidu vodíku	29
3.4.1.2	Stanovení peroxidu pomocí xylenové oranže (metoda podle Wolffa)....	30
3.4.1.3	Stanovení peroxidu pomocí toluidinové modři	30
3.4.2	<i>Stanovení železa pomocí fenanthrolinu</i>	30
3.4.3	<i>Stanovení TCA a abiotická chlorace</i>	31
4.	Výsledky a diskuse	33
4.1	<i>Stanovení peroxidu</i>	33
4.2	<i>Stanovení TCA</i>	42
5.	Závěr.....	47
6.	Použitá literatura.....	49

Seznam zkratek a symbolů

Cl _{org}	organicky vázaný chlor
COC	chlorované organické sloučeniny
CPO	chloroperoxidáza
DCP	2,2 – dichlorpropionová kyselina
2,5 - DMBQ	2,5-dimethoxy-1,4-benzochinon
ECD	detektor elektronového záchytu (electron capture detector)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
Fen	fenanthrolin
Fh	humusový horizont půdy
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HA	huminové kyseliny
LOD	limit detekce analytu
LOQ	limit kvantifikace analytu
M	molarita, jednotka molární koncentrace [mol·dm ⁻³]
PCB	polychlorované bifenyly
TCA	trichloroctová kyselina
XO	xylenová oranž

1. Úvod

Peroxid vodíku je přirozenou součástí lesní půdy a vzniká především díky činnosti různých půdních organismů jako jsou např. dřevokazné houby. Oxidační a hydrolytické enzymy podílející se na rozkladu dřeva, které tyto houby vylučují nemohou proniknout hluboko do dřeva, a tak houby musí využít menších činidel k zahájení rozkladu. Za počáteční degradaci hlubších vrstev jsou tedy zodpovědné hydroxylové radikály a dřevokazky tak produkují peroxid vodíku. Dále peroxid produkují mykorhizní houby či půdní bakterie *Aerococcus* (Kontchou et al. 1990) a peroxid se do půdy může dostat i díky mokré a suché atmosférické depozici (Hua et al. 2008). Peroxid vodíku v půdě, jakožto oxidant, může mít významný vliv na půdní chemii, zvláště když jeho rozklad v půdě vede ke vzniku OH radikálů díky Fentonové reakci: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$. Vznikající hydroxylový radikál je velmi silný oxidant, který reaguje s mnoha organickými a anorganickými složkami půdy a peroxid vodíku se tak v půdě účastní abiotické chlorace organických látek. Hydroxylové radikály, které vznikají při Fentonové reakci, jsou schopny oxidovat chloridy na reaktivní kyselinu chlornou a následně může proběhnout chlorace organických látek a vytváří se tak chloroctové kyseliny, těkavé chlorované uhlovodíky a chlorované uhlovodíky s vyšší molekulovou hmotností. Rozklad peroxidu v přírodních půdách může postupovat přes řadu reakcí a mechanismus není příliš dobře znám a závisí nejen na koncentraci, ale také na typu půdy.

V předchozích výzkumech se dokázalo, že po přidavcích nadměrného množství oxidující směsi $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ do půdy vznikají značná množství haloacetátů. Kyselina trichloroctová (TCA) jako jeden z produktů chlorace organických látek ovlivňuje lesní ekosystém. Dříve se používala jako herbicid a díky tvorbě v půdě je všudypřítomná. Úroveň koncentrace TCA v půdách jehličnatých lesů ve střední Evropě je významně zvýšená, její koncentrace v lesích byla stanovena v rozmezí 20-380 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Kyselina trichloroctová je dobře rozpustná ve vodě a je proto také snadno přijímána rostlinami. Fytotoxicita TCA spočívá v tom, že ve vyšších koncentracích způsobuje inhibici růstu jak výhonků tak kořenů vyšších rostlin. Dále způsobuje listovou chlorózu a nekrózu a redukuje tvorbu povrchových listových vosků.

Cíle práce:

Peroxid hraje důležitou roli při abiotické chloraci, a proto je potřeba znát jeho efektivní koncentraci v půdě. K měření H_2O_2 lze použít řady analytických optických, elektroanalytických či chromatografických metod. Cílem této práce bylo:

- Optimalizace časově a přístrojově nenáročné spektrofotometrické metody za použití xylenové oranže pro stanovení H_2O_2 v lesní půdě. Metoda je vhodná k měření nízkých koncentrací hydroperoxidů, ale prozatím nebyla použita pro půdní vzorky.
- Nalezení vhodného extrakčního činidla, stanovení analytických parametrů: meze detekce, opakovatelnost a linearita.
- Porovnání metody za použití xylenové oranže s jinými stanoveními peroxidu.
- Stanovení stálosti peroxidů v půdě.
- Příprava a kalibrace GC-ECD metody k měření vzniklé TCA s přidávkou reálných koncentrací H_2O_2 .

2. Teoretická část

2.1 Zdroje H_2O_2

2.1.1 Houby produkující peroxid vodíku

Peroxid vodíku se do půdy dostává především díky činnosti různých půdních organismů. Peroxid vodíku v půdě je mimo jiné také produktem mykorhizní symbiózy (Salzer et al. 1999). Dalšími producenty peroxidu jsou bazidiomycety, především houby rozkládající dřevo. Saprotrofické houby produkují celulózu a lignin hydrolyzující enzymy a přispívají tak významně k rozkladu pozůstatků mrtvých rostlin a tím k tvorbě půd. Nejdůležitější organismy, které hrají roli při rozkladu dřeva jsou bělohnílnobné a hnědohnílnobné houby (Tornberg et al. 2002).

Bělohnílnobné houby degradují všechny složky lignocelulózy, hnědohnílnobné houby mineralizují polysacharidy, ale nejsou schopny depolymerizace ligninu. Počáteční fáze degradace hnědohnílnobnými houbami se odehrává ve vnitřní vrstvě stěn buněk dřeva (S_2 vrstva), zatímco vrstva blízká k hyfě (S_3 vrstva) zůstává nezměněná. Oxidační a hydrolytické enzymy podílející se na biodegradaci lignocelulózy, které dřevokazné houby vylučují nemohou proniknout hluboko do dřeva, a tak houby musí využít menších činidel k zahájení rozkladu. Za počáteční degradaci S_2 vrstvy jsou tedy zodpovědná malá oxidační činidla a enzymy pak dále pronikají do S_3 vrstvy stěn buněk dřeva (Tornberg et al. 2002, Kenneth et al. 2002).

Bazidiomycety, které způsobují bělohnílnobný rozklad dřeva jsou hlavní příčinou biodegradace dřevitých struktur. Tyto houby degradují přednostně polysacharidy dřeva, ale také částečně oxidují lignin. Tanaka a kol. zjistili, že v kultuře lignin rozkládajících bělohnílnobných hub *Trametes versicolor* byli produkovány hydroxylové radikály ($\bullet OH$) (Tanaka et al. 1999). V několika studiích se poukázalo na to, že právě tyto radikály jsou malá neenzymatická činidla, která se účastní hnědohnílnobného a v menším rozsahu i bělohnílnobného rozkladu.

Hydroxylové radikály jako nejúčinnější oxidační činidla jsou v biologických systémech produkovány pomocí Fentonové reakce (rovnice 1) (Tornberg et al. 2002, Koenigs 1974), a proto dřevokazné houby musí redukovat extracelulární Fe^{3+} a produkovat H_2O_2 . Jak toho dosáhnou není příliš dobře známo, ale předpokládá se, že houby vylučují

nízkomolekulární látky (M_r 1000–5000), které katalyzují redoxní reakce mezi molekulárním kyslíkem a elektronovým donorem a produkují tedy hydroxylové radikály skrze peroxid (Enoki et al. 1997). Mezi tyto látky mohou patřit cellobióza dehydrogenáza nebo železo obsahující katecholy, které mohou zahájit fentonovou reakci redukcí Fe^{3+} mimo mycelium hub (Jensen et al. 2001).

Například hnědohnilobná houba *Gloeophyllum trabeum* používá extracelulárního hydrochinon-chinonového redoxního cyklu k redukcí Fe^{3+} a produkci H_2O_2 . *G.trabeum* produkuje dva extracelulární chinony a to 2,5-dimethoxy-1,4-benzochinon (2,5-DMBQ) a 4,5-dimethoxy-1,2-benzochinon (4,5-DMBQ) které procházejí na železu závislém redoxním cyklu. Tyto chinony redukují Fe^{3+} (rovnice 2). Produktem reakce je 2,5-DMHQ semichinonový radikál, který dále reaguje s O_2 a vzniká perhydroxyl radikál ($\bullet OOH$) (rovnice 3). H_2O_2 vzniká když $\bullet OOH$ a jeho konjugované báze, superoxid, dismutáza nebo když kterýkoliv z těchto oxyradikálů je redukován Fe^{2+} . Je také možné, ale není to prokázané, že nějaké semichinony redukují Fe^{3+} (rovnice 4). A nakonec houbové mycelium redukuje 2,5-DMBQ na 2,5-DMHQ a tak dokončí redoxní cyklus (rovnice 5) (Jensen et al. 2001).



Příklady hub rozkládajících dřevo:

Celulózní houby neboli hnědohnilobné houby: houby rozkládající celulózu a hemicelulózy. *Antrodia vaillantii*, *Gloeophyllum trabeum*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Coniophora puteana* (Tornberg et al. 2002, Jensen et al. 2001)

Lignivorní houby neboli běloohnilobné houby: houby rozkládající lignin i celulózu a hemicelulózy. *Trametes versicolor*, *Crucibulum laeve*, *Hypholoma fasciculare*, *Collybia maculata*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pholiota spumosa* (Tornberg et al. 2002)

2.1.2 Bakterie produkující peroxid vodíku

Dále mohou být producenty peroxidu bakterie např.: půdní aerobní bakterie kmene *Aerococcus*. Kontchou a Blondeau izolovali z různých půdních vzorků (zahradní, lesní, luční, kultivované a nekultivované polní půdy) soubor 16 kmenů půdních bakterií produkujících H_2O_2 a identifikovali je jako *Aerococcus sp.* Tyto bakterie mohou být podmíněně i anaerobní, ale za nepřítomnosti kyslíku nedochází k tvorbě peroxidu vodíku (Kontchou and Blondeau 1990).

2.1.3 Atmosférická depozice peroxidu vodíku

Značné množství peroxidu se může dostávat do půd díky mokré a suché atmosférické depozici. Dešťová voda obsahuje koncentrace peroxidu v rozmezí od 0,1 μM do 300 μM (Hellpointner and Gab 1989, Pena et al. 2001, Sauer et al. 1997). Na příklad v roce 2006 v jižní Číně v rustikální oblasti ležící asi 50 km od města Guangzhou měřili množství peroxidů v dešťové vodě. Při bouři maximální koncentrace peroxidu činila 21 μM (Hua et al. 2008). To se významně nelišilo od koncentrací v jiných krajinných oblastech a přírodních míst nad oceánem. V tabulce 1 jsou uvedeny koncentrace peroxidu v několika různých lokalitách.

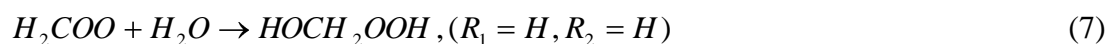
Tab. 1: Množství peroxidu v dešťové vodě z různých oblastí

Oblast	Koncentrace $H_2O_2/\mu M$
Pacifik východně od Mexika (Padilla et al.2007)	13
Mexický záliv (Cooper et al. 1987)	40
Florida (Cooper et al.1987)	28
Atlantský oceán (Cooper et al. 1987)	13
Pointe de Penmarc'h (Francie) (Sauer et al. 1997)	1,5

Vznik hydroperoxidů ozonolýzou:

Při ozonolýze alkenů (např. izopren, terpeny, ethen, propen a izobuten a dalších látek produkovaných rostlinami) mohou vznikat různé peroxidy. Od počátečního vsunutí ozonu do dvojné vazby a vytvořením primárního ozonidu pokračuje ozonolýza jeho rozložením a vede tak ke vzniku excitovaných Criegeeho intermediátů (ECI) $[R_1R_2COO]^*$ a karbonylových sloučenin. ECI jsou biradikály s přebytkem energie a některé z nich se stanou stabilizovanými Criegeeho intermediáty (SCI) R_1R_2COO interakcí s médiem a tyto SCI mohou dále reagovat a vznikají hydroperoxidy. Nedávné laboratorní studie odhalily že $R_1R_2C(OH)OOH$ mohou vznikat reakcí SCI s vodní párou. Tyto $R_1R_2C(OH)OOH$ se rozkládají hlavně na H_2O_2 a karbonylové sloučeniny R_1COR_2 (rovnice 6-8).

Hydroperoxidy vzniklé ozonolýzou nebo jinou cestou se můžou zúčastnit Fentonové reakce stejně tak následně vzniklý peroxid vodíku a tím vytvořit reaktivní OH radikály.



2.2 Rozklad peroxidu v půdě

Peroxid v půdě, jakožto oxidant, může mít významný vliv na půdní chemii, zvláště když jeho rozklad v půdě vede ke vzniku OH radikálů díky Fentonové reakci (rovnice 9):



kde M^{n+} a M^{n+1} představují redukovanou a oxidovanou formu redox aktivních kovů.

Hydroxylový radikál je velmi silný oxidant, který reaguje s mnoha organickými a anorganickými složkami půdy (Petigara et al. 2002). Množství peroxidu dodané do půd, které tvoří následně milimolární koncentrace může být využito také k remediaci kontaminovaných půd a sedimentů. Mezi tyto polutanty patří i látky, které jsou jen těžko nebo nejsou vůbec odbouratelné většinou běžných remediačních technologií jako např.

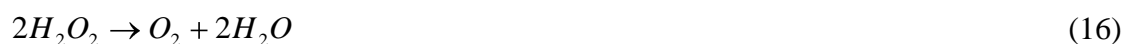
PCB (Ravikumar and Gurol 1994). Přídavkem peroxidu se produkují OH radikály pomocí Fentonové reakce a tyto oxidují znečištění. Ačkoliv je mechanismus rozkladu H_2O_2 v těchto systémech známý mnohem méně se ví o mechanismech rozkladu v přírodních půdách. Rozklad peroxidu v půdách může postupovat přes řadu reakcí a první z nich můžou být nejjednodušeji popsány reakcemi 10-13, které popisují železem katalyzovanou Haber-Weissovou reakci:



Hydroxylové radikály vznikající při reakci 14 můžou reagovat s peroxidem (rovnice 15):



Konečná reakce (rovnice 16):

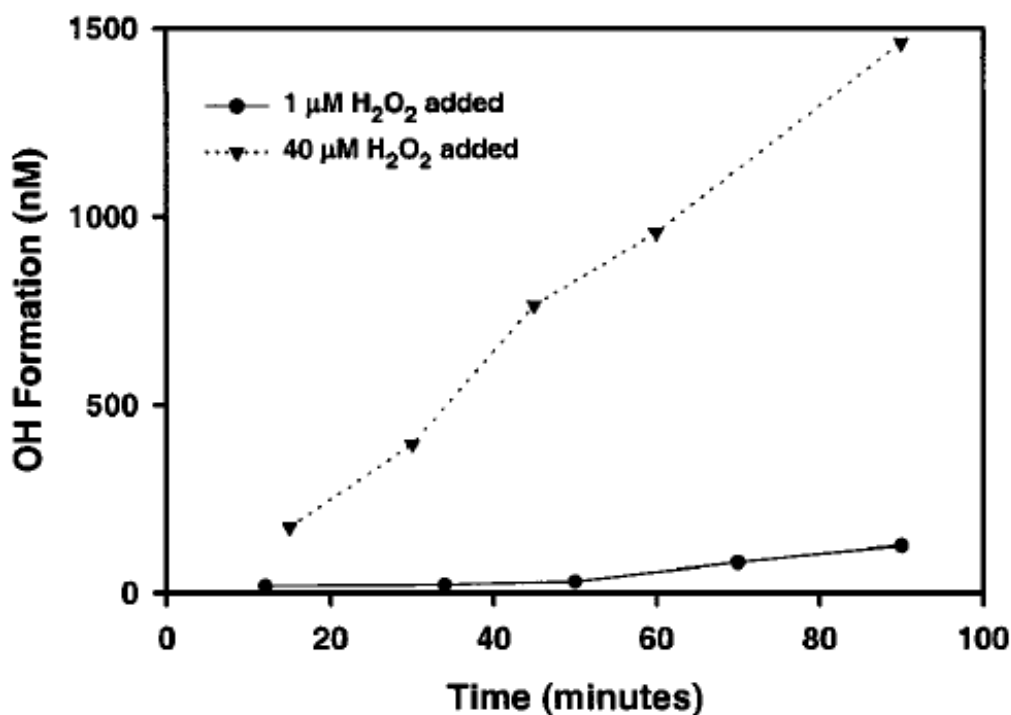


Reakce 16 představuje Fe-katalyzovanou reakci postupující přes radikálové intermediáty. Tento mechanismus bude produkovat OH radikály ve vysokých množstvích během rozkladu H_2O_2 . Při dostatečných vysokých koncentracích budou organické a anorganické půdní složky reagovat s OH radikály a tak sníží rychlost rozkladu peroxidu a sníží i množství vznikajícího O_2 .

Peroxid může být také rozložen peroxidickým typem reakce 17, kde H_2O_2 oxiduje redukované půdní částice (S_{RED} na S_{OX}) pomocí dvou-elektronového procesu zatímco sám se redukuje na H_2O . Tento typ reakce je katalyzován peroxidázou, jestli může být katalyzovaný i abioticky kovem není známo.



Spektrum cest rozkladu peroxidu tedy zahrnuje tři typy mechanismu, jmenovitě Haber-Weissův mechanismus, katalázový typ a peroxidázový typ a rozklad závisí na relativní koncentraci H_2O_2 a typu půdy. Na obrázku 1 je znázorněna tvorba hydroxylových radikálů v závislosti na čase (Petigara et al. 2002).



Obr. 1: Závislost tvorby OH radikálů na čase v půdní suspenzi (voda:půda 25:1)
(Petigara et al. 2002)

2.3 Chlorované organické látky

Až donedávna se obecně věřilo, že všechny chlorované organické sloučeniny (COC) jsou xenobiotika, že se chlor nezúčastňuje biologických procesů, a že je přítomný v životním prostředí pouze ve formě chloridů. Chlor se ovšem v půdě nevyskytuje pouze jako jeho iontová forma, ale ukázalo se, že organický chlor (Cl_{org}) je v prostředí stejně tak hojný nebo dokonce hojnější než chlorid (Öberg 2002, Rodstedth et al. 2003). Organické látky obsažené v půdách z mírných stále zelených lesů obsahují 0,05% organicky vázaného chloru. Dalo by se dokonce říci, že množství organických látek je

limitujícím faktorem pro vznik Cl_{org} . Koncentrace Cl_{org} musí být tedy nízká tam, kde je i nízký obsah organických látek (Asplund et al. 1991). Stupeň chlorace se zvyšuje s půdní hloubkou a dosahuje 2-10 mg organicky vázaného chloru na gram organického uhlíku. Odhadem je ve svrchních 60 cm půdy až 0,6 t/ha organicky vázaného chloru (Winterton 2000).

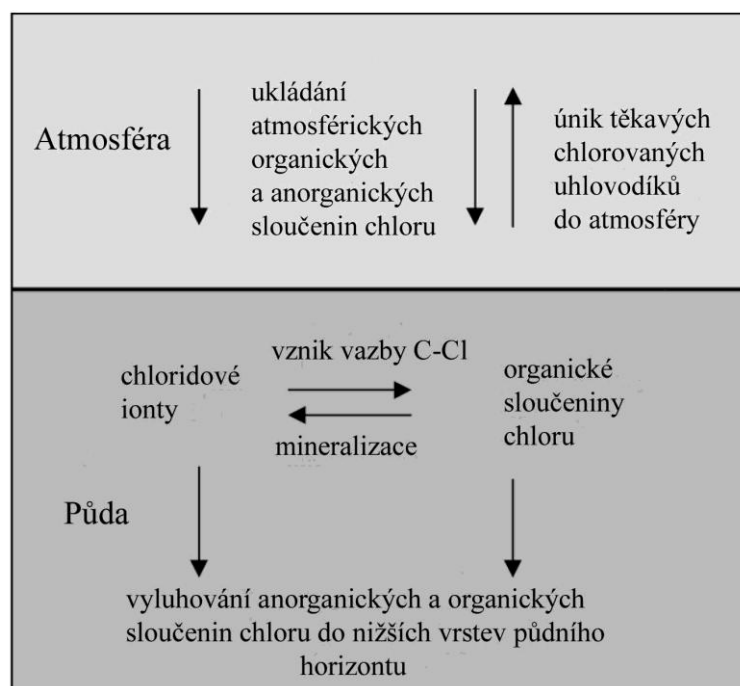
Asi 2000 známých sloučenin chloru, jak anorganických tak organických je produkováných, transformováných, transportováných a degradováných v řadě přírodních geologických, chemických a biochemických procesů. Dříve se o látkách jako jsou chloroform, chlorofenoly, chloroctové kyseliny a polychlorované dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany dlouho věřilo, že vznikají pouze z lidské činnosti (Winterton 2000). Po letech výzkumu se však odhalilo, že se chlor podílí na složitých biogeochemických cyklech, že je jeden z hlavních prvků půdních organických látek (Öberg 2002). Např. chloroform vzniká v půdě z jednoduchých organických látek (např. acetonu, propionové kyseliny, citronové kyseliny) pomocí chloroperoxidáz (CPO) (Fahimi et al. 2003). Mimo to byla vyslovena domněnka, že procesy chlorace jsou obzvláště účinné a konečná rychlost těchto procesů je nezávislá na obsahu chloridových iontů v půdě (Winterton 2000). Množství přírodně tvořeného Cl_{org} přítomného v životním prostředí může být počítáno na tuny na km^2 , ale je málo známo ohledně základních procesů a vlivu environmentálních faktorů (Öberg 2002).

Dále se dříve předpokládalo, že všechny COC jsou perzistentní a toxické i když široká většina těchto přírodně produkováných látek není ani stálá ani toxická. A dalším chybným předpokladem bylo, že pouze pár spíše specializováných organismů je schopno přeměnit chloridy na Cl_{org} i když se zdá, že schopnost mezi organismy transformovat chloridy na Cl_{org} je spíše pravidlem než výjimkou. Půdní organismy jsou vůbec důležité potenciální zdroje organochlorováných sloučenin. Např. houby produkují jak těkavé tak netěkavé organochlorované látky ve značných množstvích (Öberg 2002).

Stejně jako probíhá tvorba chlorováných organických látek odehrává se i jejich degradace. Tato degradace ovšem probíhá v menší míře a proto z hlediska dlouhodobějšího časového horizontu dochází v půdě k nárůstu Cl_{org} . K úbytku Cl_{org} v půdě dochází úplnou mineralizací na Cl^- nebo částečnou degradací na polární nízkomolekulové COC, např. chloroctové kyseliny, které můžou být podobně jako Cl^- z půdy vyplavené nebo přeměněné na těkavé COC, např. $CHCl_3$, které se uvolňují do

atmosféry (Öberg 1998). Je jasné, že se Cl_{org} chová jako ostatní organické látky a je transportován z vrchních vrstev půdy do podzemní vody, část je v půdě zadržována a jistá malá část je luhována do povrchové vody. Množství, které se vyluhuje do povrchových vod je závislé na okolních podmínkách jako je roční období, množství srážek a množství Cl_{org} . Např. na podzim se dostává do půdy čerstvý humus, který obsahuje velké množství relativně snadno degradovatelných organických látek. Zvýšená aktivita organismů zpracovávající tyto látky vede následně až ke zvýšení obsahu Cl_{org} a jeho vyluhování z půdy (Svensson et al. 2007).

Transport, transformace a akumulace chloridových a chlororganických sloučenin v půdě je uvedena jsou uvedeny na obrázku 2. Každá látka v cyklu chloru by měla být studována zvlášť, ale protože je TCA jednou z nejlépe známých látek degradace COC uvádím dále v souvislosti s koloběhem chloru jako příklad její vznik, osud a zánik.



Obr. 2: Transport, transformace a akumulace chloridových a chlororganických sloučenin v půdě (Winterton 2000)

2.4 *Kyselina trichloroctová*

Kyselina trichloroctová (TCA) je jedním z produktů chlorace organických látek (Fahimi et al. 2003). TCA se dříve používala jako herbicid v zemědělství a na příklad od roku 1940 do roku 1990 bylo v Německu aplikováno okolo 30.000 t TCA. Takový

permanentní přísun tohoto herbicidu do citlivých ekosystémů vedl k nepříznivým efektům na biotu (rostliny, mikroorganismy, atd). Tato kyselina ovšem vzniká v životním prostředí i mnoha dalšími způsoby (Schöler et al. 2003). Chloracetáty vznikají v atmosféře rozkladem látek jako jsou tetrachlorethen, 1,1,1-trichlorethan a trichlorethen, které se používají jako rozpouštědla a odmašťovadla (Fahimi et al. 2003). Dalším antropogenním zdrojem TCA jsou spalovací procesy za předpokladu, že jsou přítomny chloridy a redox-citlivé prvky, jako Fe nebo Cu, např. požár lesa nebo spalování odpadů a také vzniká při chloraci v úpravnách vod (Schöler et al. 2003, Juuti et al. 1995, Hoekstra 2003).

Jedním zdrojem TCA v půdě je atmosférická depozice po fotochemické reakci již zmíněných chlorovaných uhlovodíků. Druhým je in-situ chlorace organických látek biotickou cestou za přispění mikroorganismů a/nebo v přítomnosti CPO (Laturnus et al. 2005). A za třetí, TCA může vznikat, stejně jako ostatní COC, abiotickou cestou.

Za účelem otestování třetí cesty Fahimi et al. (2003) provedli experimenty kde zkoumali vliv Fe^{3+} , Fe^{2+} , H_2O_2 a chloridu na vznik TCA. Samotný přídavek buď H_2O_2 nebo Fe^{3+} ke vzorku půdy s NaCl neměl téměř žádný efekt na vznik haloctové kyseliny. Avšak přídavek oxidující směsi $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ a $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ už vedl k významnému zvýšení vzniku haloacetátů. Vznik chloroctových kyselin tedy pravděpodobně probíhá pomocí Fentonové reakce: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$. Vznikající hydroxylové radikály jsou schopny oxidovat chloridy na reaktivní elementární chlor a následně může proběhnout chlorace organických látek. Vazba C-Cl pravděpodobně vzniká pomocí radikálového mechanismu (Fahimi et al. 2003). Příspěvky množství TCA vznikající z výše zmíněných tří reakcí a tedy v různých podmínkách jsou proměnlivé.

TCA je nyní všudypřítomná a skoro rovnoměrně distribuovaná ve srážkách na severní i jižní polokouli (Schöler et al. 2003). TCA byla nalezena v různých prostředích včetně močálů, ledovců, sněhu, dešti, pramenité vodě, půdě, v pletivech rostlin i v tkáních živočichů (Haiber et al. 1996, McCulloch 2002). Úroveň koncentrace TCA v půdách jehličnatých lesů v horských regionech ve střední Evropě je významně zvýšená (Winterton 2000). Koncentrace TCA ve vzduchu je mezi 0,03 a 0,32 ng/m³ (průměr 0,1 ng/m³) v urbanizovaném prostředí a 0,29-2,6 ng/m³ (průměr 1 ng/m³) v lesích. V roce 1988 byla koncentrace TCA v půdě v jehličnatých lesích v Schwarzwald v Německu stanovena v rozmezí 20-380 µg/kg (Schöler et al. 2003). Koncentrace TCA v jehličí

z lesů severního Finska byla mezi 1-180 µg/kg (Winterton 2000). TCA byla nalezena i v ČR v jehličí smrků, borovic, jedlí i dalších dřevin a to v koncentracích od několika jednotek až po 200 µg/kg jehličí (Matucha et al. 2000).

Také je známo, že koncentrace TCA klesá s hloubkou půdy (Schöler et al. 2003), a že poločas biodegradace v půdě je odhadován na 14-90 dní a neočekává se že by se trichloroctová kyselina akumulovala (Winterton 2000). TCA se v půdě odbourává různými procesy. Hlavní faktory vedoucí ke snížení koncentrace TCA jsou následující:

- a) Fotochemický rozklad. Poločas rozkladu TCA je ve vzduchu odhadován na 446 dní. Avšak sluneční záření nemůže pronikat do půdy. Fotochemický rozklad tedy není zodpovědný za snižování TCA v půdě.
- b) Půdní adsorpce a luhování. Mobilita TCA v půdě je značná. Rozpustnost TCA je 1300 g/l. Díky půdní vlhkosti může TCA relativně rychle pronikat do hloubky a také je rychle přijímána kořeny rostlin (Schöler et al. 2003, McCulloch 2002).
- c) Příjem rostlinami. TCA byla nalezena v jehličí v různých koncentracích. Koncentrace je totiž závislá na jednotlivých stromech.
- d) Chemický rozklad. TCA je snadno degradabilní, hlavně v alkalickém prostředí.
- e) Biologická a mikrobiologická degradace. Jsou známy některé bakterie a houby, které mohou odbourávat COC: bakterie: *Arthrobacter* sp. a *Pseudomonas dehalogens*, houby: *Trichoderma viride* (Schöler et al. 2003, Matucha et al. 2003).

Odbourávání TCA v půdě také závisí na teplotě, vlhkosti a typu půdy. Nejlépe rozklad TCA probíhá za teplých a vlhkých podmínek a nejhůře probíhá v písečných půdách. Perzistence TCA v půdě se uvádí jak již bylo uvedeno výše na 14-90 dní v závislosti na typu půdy (Schöler et al. 2003).

Protože je TCA vysoce rozpustná ve vodě, je v půdě mobilní a je rychle přijímána kořeny rostlin (McCulloch 2002). Na rozdíl od ostatních lipofilních chlorderivátů se neakumuluje přednostně v listové kutikule, ale je přijímána snadnější cestou přímo z půdy přes kořeny s transpiračním proudem do asimilačních orgánů dřevin (Forczek 2005).

Fytotoxicita TCA spočívá v tom, že ve vyšších koncentracích způsobuje inhibici růstu jak výhonků tak kořenů vyšších rostlin (Uhlířová et al. 2002). Dále způsobuje listovou chlorózu a nekrózu a redukuje tvorbu povrchových listových vosků (Norokorpi and Frank 1995).

Frank et al. (1994) zjistili, že existuje jistá korelace mezi obsahem TCA v jehličí a stupněm defoliace a poškozením povrchové voskové vrstvy. Byl zjištěn vyšší výskyt TCA v asimilačních orgánech poškozených borovic, které rostou v oblastech, kde byly ostatní emise nízké. Průměrná koncentrace TCA v lesní borovici v Roveniemi ve Finsku byla 8-65 ng/g (Norokorpi et Frank 1995). Předpokládá se tedy, že obsah TCA v asimilačních orgánech převyšující 100 ng/g znamená již pro dřeviny významnou zátěž (Uhlířová et al. 2002).

Výsledky experimentů, ve kterých byla ke studiu příjmu a translokaci TCA ve smrku ztepilém užita TCA značená radioaktivním izotopem uhlíku ^{14}C , svědčily o tom, že příjem TCA je preferován kořeny. Dále se prokázalo, že příjem je závislý na intenzitě transpiračního proudu, tedy na stáří a poloze jehličí (Matucha et al. 2000). K akumulaci dochází nejprve v nejmladším jehličí a později ve starším (Uhlířová et al. 2002).

Distribuce nalezené radioaktivity TCA značené radioaktivním izotopem uhlíku ^{14}C mezi jednotlivými částmi je znázorněna v tabulce 2. Při bilancování radioaktivity byly zjištěny ztráty, které byly přisouzeny produktu biodegradace (CO_2) unikajícímu do okolní atmosféry (Uhlířová et al. 2002).

Tab. 2: Distribuce nalezené radioaktivity $[1,2-^{14}\text{C}]\text{TCA}$ mezi jednotlivými kompartmenty [%] (Matucha et al. 2000)

Kompartment	Radioaktivita [%]
Půda	76,29
Ovzduší	15,38
Smrk celkově	8,34
Dřevo kmene	0,08
Dřevo větví	0,92
Jehličí	3,94
Kořeny	3,40

2.5 Stanovení H_2O_2

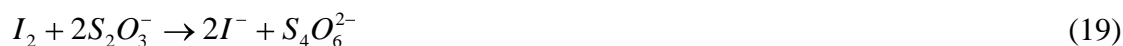
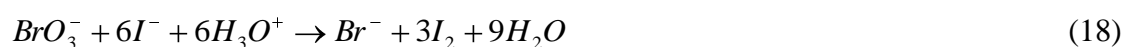
K měření H_2O_2 lze použít řady analytických optických (Wolff 1994, Sunil et al. 2008), elektroanalytických (Schachl et al. 1997) či chromatografických metod (Hellpointner and Grab 1989). V této práci jsem stanovila H_2O_2 pomocí jodometrické titrace a spektrofotometricky pomocí xylenové oranže a toluidinové modři.

2.5.1 Jodometrické stanovení zásobního roztoku peroxidu vodíku

Zásobní roztok peroxidu vodíku byl stanoven jodometrickou titrací na thiosíran sodný. Jako indikátor se používá škrobový maz.

Standardizace odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$:

Základní látkou pro standardizaci zásobního roztoku thiosíranu je bromičnan draselný. $KBrO_3$ se nejprve převede přidavkem nadbytku jodidu na odpovídající množství jódu (rovnice 18) a vzniklý I_2 se poté titruje thiosíranem sodným na roztok škrobu (rovnice 19) (Šrámek et al. 1996).



Stanovení H_2O_2 :

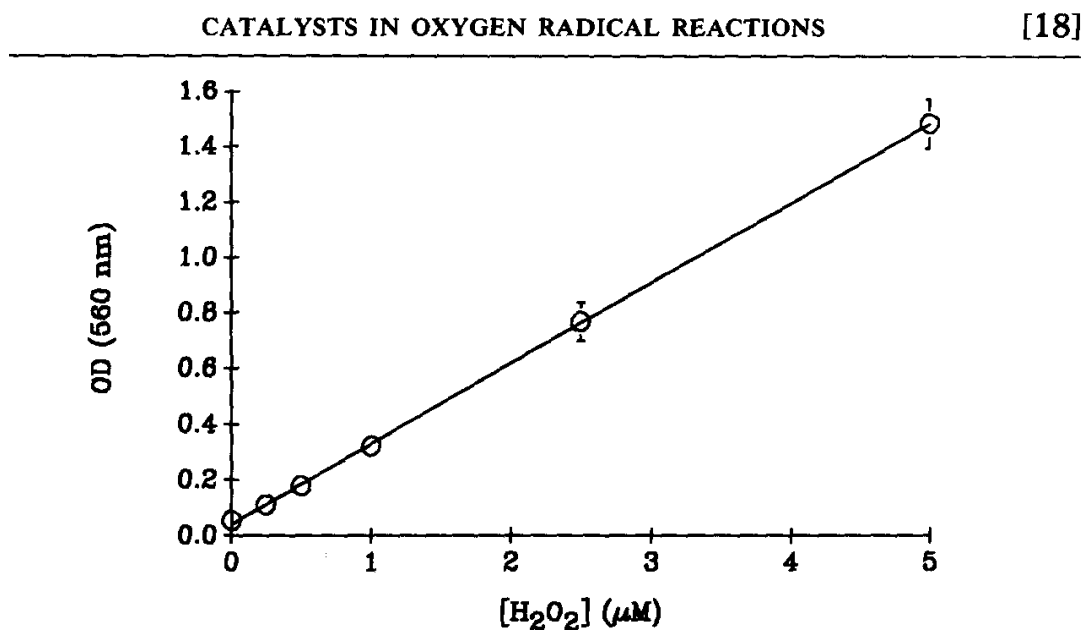
Peroxid vodíku se stanovuje nepřímou titrací. Přídavek nadbytku jodidu se peroxidem vodíku oxiduje na odpovídající množství jodu (rovnice 20) a vzniklý I_2 se dále titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného, indikátorem je škrobový maz a katalyzátorem reakce je $(NH_4)MoO_4$ (rovnice 19).



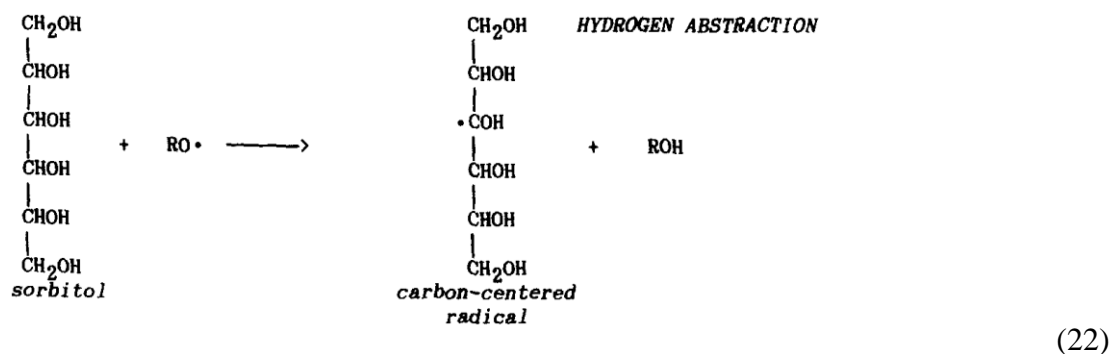
2.5.2 Stanovení peroxidu pomocí xylenové oranže (metoda podle Wolffa)

Tato metoda měření hydroperoxidů je založeno na selektivní oxidaci Fe^{2+} iontů peroxidem na Fe^{3+} v kyselém prostředí za přítomnosti činidla (25 mM H_2SO_4 , 250 μM $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, 100 mM Sorbitol, 100 μM xylenolová oranž (XO)). Hydroxylové radikály vznikající redukcí peroxidů v reakci 21 mohou být využity k další

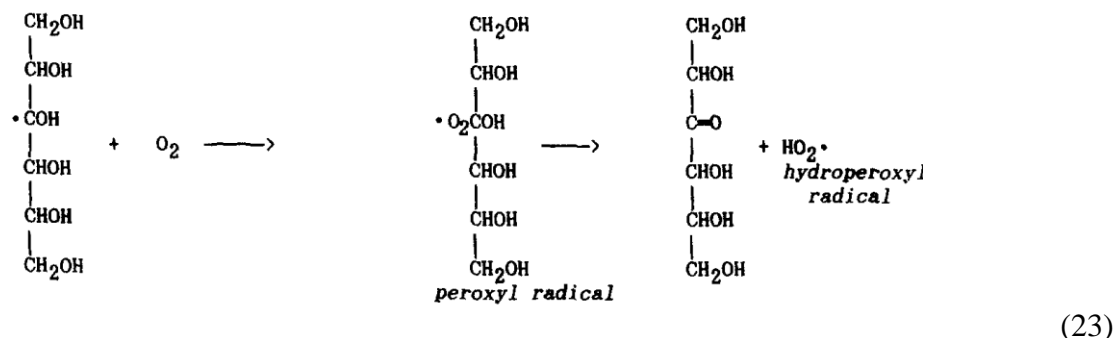
oxidaci Fe^{2+} iontů díky řetězové reakci stimulované zařazením sorbitolu (rovnice 22-24). Vznikající železité ionty vytváří s xylenovou oranží barevný komplex jehož množství se pak určuje absorpční spektrofotometrií při $\lambda=560$ nm (rovnice 25). (Wolff 1994) Na obrázku 3 je kalibrační křivka pro měření peroxidu vodíku ve vodě.



Obr. 3: Kalibrační křivka H_2O_2 (Wolff 1994)

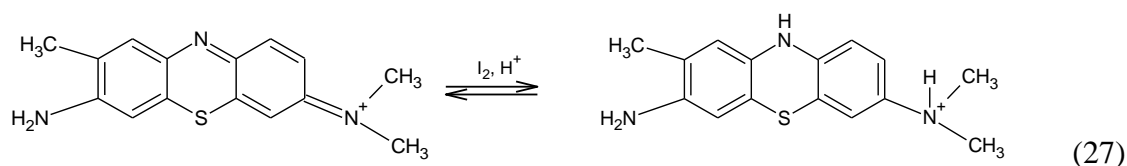
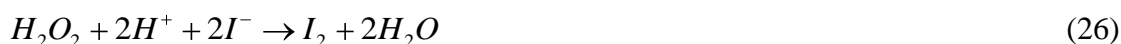


OXYGEN ADDITION



2.5.3 Stanovení peroxidu pomocí toluidinové modři

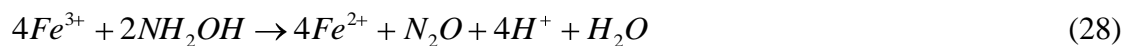
Tato metoda je založena na reakci jodidu s peroxidem v kyselém prostředí. Vznikající jód odbarvuje modrý toluidin a barevná změna se měří absorpční spektrofotometrií při $\lambda=630$ nm (rovnice 26, 27). K zamaskování potenciálních železnatých iontů se kterými by mohl extrahovaný peroxid reagovat lze použít EDTA (Sunil et al. 2008).



2.6 Stanovení železa pomocí fenanthrolinu

Půdy mohou obsahovat značné množství železa. Při stanovení peroxidu metodou pomocí xylenové oranže, která je založená na oxidaci železa, může přítomné železo v půdě způsobit systematickou chybu s přehodnocením množství peroxidu. Proto je potřeba stanovit obsah železa ve vzorcích. Stanovení železa pomocí fenanthrolinu se provádí spektrofotometricky a je založeno na selektivní reakci Fe^{2+}

s 1,10 – fenanthrolinem (fen) se kterým vytváří červený komplex $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ viz reakce 29. Při stanovení železa se proto ionty Fe^{3+} nejprve redukují hydroxylaminem v slabě bazickém prostředí octanu amonného na kationty Fe^{2+} viz reakce 28.



2.7 Spektrofotometrie

Molekulovou absorpční spektrometrií ve viditelné oblasti lze stanovit látky, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 380 – 770 nm. Vlnová délka pohlceného záření neodpovídá barvě látky jakou vnímá lidské oko, ale barvě komplementární. Nastává-li absorpce záření látkou, liší se velikost absorpce pro různé vlnové délky. Platí, že čím větší množství absorbujících částic bude v dráze paprsku, tím bude absorpce větší. To vyjadřuje Lambertův-Beerův zákon (rovnice 30) (Opekar et al. 2003, Klouda 1996).

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot d \cdot c \quad (30)$$

kde: A_λ je absorbance roztoku při vlnové délce λ , ε_λ je molární absorpční koeficient barevného produktu [$\text{L/mol} \cdot \text{cm}$], d je optická dráha paprsku, tedy tloušťka kyvety [cm] a c je molární koncentrace analytu [mol/L].

Tento zákon platí jen pro zředěné roztoky, kde je možné zanedbat změnu indexu lomu měřeného roztoku se změnou koncentrace barevné látky. Absorbance je definována jako záporný dekadický logaritmus transmittance (rovnice 31).

$$A = -\log T \quad (31)$$

Transmitance je podíl zářivého toku vystupujícího z absorbujícího prostředí a zářivého toku vstupujícího do absorbujícího prostředí (rovnice 32) (Němcová et al. 2004, Klouda 1996).

$$T = \Phi / \Phi \quad (32)$$

2.8 Stanovení TCA a plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu

TCA se stanovuje ve formě methylesteru a to metodou GC-ECD za použití plynového chromatografu s detektorem elektronového záchytu. Jako derivatizační činidlo slouží diazomethan nasycený v etheru. Vnitřním standardem ke stanovení TCA byla kyselina dichlorpropionová (DCP).

GC-ECD je spojení dvou analytických metod, které se využívá ke stanovení vzorků obsahujících těkavé látky. Plynová chromatografie je separační metoda založená na interakci plynného vzorku s mobilní a stacionární fází při průchodu chromatografickou kolonou. Vzorek je kolonou unášen mobilní fází, kterou je inertní plyn a ve spojení ECD se používá helium. Vzorek je při průchodu kolonou zpomalovaný, protože dochází k opakované adsorpci a desorpci na stacionární fázi kolony. V GC se nejčastěji používá kapilární kolona, kde je stacionární fáze ve formě tenké vrstvy, která je navázaná přímo na stěnu kolony.

Jednotlivé složky vzorku mají ke stacionární fázi různou afinitu a jejich pohyb kolonou je pro každou složku vzorku různě zpomalený a tím dochází k jejich oddělení. Retenční čas dané složky vzorku tedy čas od nástřiku vzorku do průchodu maximální koncentrace složky detektorem závisí na afinitě dané složky k použité stacionární fázi a je tedy pro danou složku charakteristický.

Vzorek se dává mikrodávkačem přes těsnění ze silikonové gumy. Aby se zabránilo kontaminaci dávkače a kolony je nutné před vlastním dávkováním odstranit vodu a dávkovat vzorky ve kterých jsou všechny složky dostatečně těkavé. Dostatečná těkavost se zabezpečuje derivatizací.

K optimalizaci separace jednotlivých složek vzorku je důležitá volba teplotního programu. Aby se předešlo kondenzaci musí minimální teplota kolony přesahovat teplotu varu složky s nejvyšší teplotou varu.

Dalším krokem analýzy je detekce separovaných složek probíhající na detektoru elektronového záchytu (ECD). Jeho podstatou je β -zářič (většinou izotop ^{36}Ni) emitující rychlé elektrony. Tyto elektrony interagují s částicemi mobilní fáze čímž dochází k ionizaci molekul nosného plynu a emisi sekundárních termálních elektronů. Díky přítomnosti těchto elektronů prochází mezi anodou kterou je stěna detektoru a katodou elektrický proud. Když se do detekčního prostoru dostane z výstupu chromatografické kolony látka, která pohlcuje termální elektrony, tak poklesne jejich počet a tím poklesne i hodnota procházejícího proudu. Pokles proudu závisí na druhu a koncentraci vystupující látky (Opekar et al. 2003).

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

V této diplomové práci byly použity chemikálie o čistotě p.a.:

Jodometrické stanovení zásobního roztoku peroxidu vodíku:

Bromičnan draselný, Lachema, Česká republika

Thiosíran sodný, Lachema, Česká republika

Molybdenan amonný, Lachema, Česká republika

Škrobový maz, připraven v laboratoři

Stanovení peroxidu pomocí xylenové oranže (metoda podle Wolffa):

Xylenová oranž, Sigma-Aldrich, Německo

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Lachema, Česká republika

Sorbitol, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina sírová, 95-97%, Fluka, Německo

Aceton, Penta, Česká republika

Dihydrogen – fosforečnan draselný, Lachema, Česká republika

Methanol, Lach – Ner, Česká republika

Peroxid vodíku, Penta, Česká republika

Stanovení peroxidu pomocí toluidinové modři:

Jodid draselný, Lachema, Česká republika

Toluidinová modř, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina chlorovodíková 98%, Fluka, Německo

Octan sodný, Lachema, Česká republika

Ethylendiamin - tetraoctová kyselina, Sigma-Aldrich, Německo

Stanovení železa pomocí fenanthrolinu:

1,10 – fenanthrolin, Sigma-Aldrich, Německo

Síran železito – amonný, Lachema, Česká republika

Hydroxylamin, Lachema, Česká republika

Octan amonný, Lachema, Česká republika

Stanovení TCA:

Hydroxid draselný, Lach – Ner, Česká republika

Chlorid sodný, Lachema, Česká republika
Diethylether, Penta, Česká republika
Toluen, Lach – Ner, Česká republika
Nitrosomethyl močovina, Sigma-Aldrich, Německo
Trichloroctová kyselina, Sigma-Aldrich, Německo
Dichlorpropionová kyselina, Merck, Německo
Diazomethan, připraven v laboratoři

Postup přípravy diazomethanu:

Do Erlenmayerovy baňky s 20 ml diethyletheru, který je převrstven nad 7 ml chlazeného 40% hydroxidu draselného, vnášíme po malých dávkách celkem 0,02 mol nitrosomethylmočoviny. Teplota přitom nesmí přestoupit +5°C. 10 minut po posledním přidání se odlije etherický roztok diazomethanu a suší se po dobu 3 hodin malým množstvím tuhého hydroxidu draselného.

3.2 Použité pomůcky a přístroje

Spektrometr – Hélios Unicam Beta, Velké Británie
Centrifuga (chlazená na 4 °C) – Hettich Universal 320R, Německo
Ultrazvuková lázeň (neohříváná) – Kraitex K9, Slovensko
Vortex – LE 210, MTA, Maďarsko
Plynový chromatograf – Varian 3400, USA
Třepačka – MEAS T22, ČR republika

3.3 Odběr a úprava vzorků půdy

3.3.1 Odběr vzorků půdy

V rámci každé lokality bylo určeno několik odběrových míst. Na každém odběrovém místě byly odebrané vzorky humusového horizontu Fh s horizontálními rozměry 15 x 15 cm. Každý vzorek byl průměrem ze tří a byl odebraný z bezprostřední blízkosti stromu a to v množství minimálně 0,5 kg.

3.3.2 *Odběrové lokality*

Lokalita Jarošov nad Nežárkou (dále jen Jarošov)

Tato lokalita se nachází v okrese Jindřichův Hradec v katastrálním území obce Jarošov nad Nežárkou, na severní straně komunikace první třídy číslo I/23 při kilometrovníku 4,0. Odběr byl provedený v porostu tvořeným převážně smrkem ztepilým a borovicí lesní. Lokalita se nachází na velmi mírně se svažujícím svahu. Půda je jílovitá a málo propustná. Na lokalitě bylo viditelné poškození dřevin – chloróza a nekróza jehlic, případně úplné vyschnutí stromů. Všechna odběrová místa této lokality byla vzdálená asi 15 m od cesty I/23.

Lokalita Plhov u Sobotky (dále jen Plhov)

Lokalita se nachází v okrese Jičín na severní straně komunikace první třídy I/16, směrem na jih od obce Plhov u Sobotky a východně od obce Sobotka. Odběrová lokalita má tvar mírně se svažujícího údolí do kterého vyúsťuje výpusť odvodňovacího kanálu cesty v jehož okolí je větší množství nekrotický smrků.

Lokalita Vršek

Lokalita se nachází v Praze v Kunratickém lese severně od místní hájovny. Lokalita je ve svažujícím se svahu s převažujícím porostem borovice lesní. Vzorek byl odebrán na jaře po oteplení.

Lokalita Potok

Lokalita se nachází v Praze v Kunratickém lese jižně od místní hájovny dva metry od kunratického potoka. V této lokalitě převažuje smrk ztepilý. Vzorek byl odebrán na jaře po oteplení.

3.3.3 *Úprava a skladování vzorků půdy*

Po odběru byly vzorky půdy skladovány při teplotě 4 °C v polyethylenových pytlích, které nebránily zcela přístupu vzduchu. Před vlastním stanovením byly vzorky homogenizované postupně přes dvě kovová síta s velikostí ok 5,6 mm a 2,8 mm.

3.4 *Pracovní postup*

3.4.1 *Stanovení H_2O_2*

3.4.1.1 Jodometrické stanovení zásobního roztoku peroxidu vodíku

Standardizace odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$:

K vypočítané navážce 6,21 g thiosíranu sodného bylo přidáno 0,5 g Na_2CO_3 jako stabilizátor rozkladu thiosíranu a doplněno destilovanou vodou do 250 mL odměrné baňky po rysku. Takto připravený odměrný roztok $Na_2S_2O_3$ byl standardizován pomocí $KBrO_3$.

Pro standardizaci odměrného roztoku thiosíranu sodného bylo naváženo do titrační baňky na analytických vahách s přesností na dvě desetiny mg 0,04 g $KBrO_3$ a přidáno 25 ml destilované vody. Dále byly do jodové baňky přidány 2 g pevného jodidu draselného a 2 mL H_2SO_4 (1:2) pro okyselení. Roztok byl po důkladném promíchání a po chvíli (2 min) titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného do slabě žlutého odstínu. Poté bylo přidáno 5 mL škrobu jako indikátoru a roztok byl dotitrován do odbarvení.

Správná koncentrace odměrného roztoku thiosíranu sodného byla vypočtena z navážky bromičnanu draselného, spotřeby odměrného roztoku a titrační stechiometrie. Navážky bromičnanu, spotřeby standardizovaného roztoku $Na_2S_2O_3$, jeho přesná koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3 na str. 33.

Stanovení H_2O_2 :

30% roztok H_2O_2 byl nejprve naředěn (0,6 ml koncentrovaného roztoku do 200 ml odměrné baňky) a do titrační baňky bylo ze zředěného roztoku pipetováno 25 ml. Následně bylo přidáno 100 ml destilované vody, 5 g KI, 2 ml kyseliny sírové (1:2) a 3 kapky 3% $(NH_4)MoO_4$. Baňka se nechala stát asi 5 min v klidu a temnu a poté se roztok titroval odměrným roztokem thiosíranu ($c = 0,1$ M) do světle žlutého zabarvení. Po přidání 5 ml škrobového mazu jako indikátoru se roztok dotitroval. Správná koncentrace roztoku H_2O_2 byla vypočtena ze spotřeby thiosíranu sodného a titrační stechiometrie a přepočtu ředění. Spotřeby thiosíranu a koncentrace H_2O_2 jsou uvedeny v tabulce 4 na str. 33.

3.4.1.2 Stanovení peroxidu pomocí xylenové oranže (metoda podle Wolffa)

Do čtyř Erlenmayerových baněk se zábrusem o objemu 50 ml bylo naváženo po 5,00 g lesní homogenizované půdy. Do každé baňky bylo přidáno 20 ml extrakčního činidla. Vzorky byly extrahovány a vždy polovina celkového času extrakce byla prováděna v ultrazvukové lázni a v druhé části extrakce se vzorky chladily v ledu. Po extrakci se vzorek převedl do centrifugační kyvety a byla provedena centrifugace 15 min při 5000 otáčkách. Následně se k supernatantu přidal 1 ml 0, 2, 4, 6 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy jako standardní přídavek. Roztoky pro standardní přídavek peroxidu byly připraveny ředěním 30% roztoku peroxidu vodíku, jehož koncentrace byla ověřena jodometricky. K spektrometrickému měření se pipetovalo 50 μl vzorku a 950 μl Wolfova činidla do 2 ml mikrozkuhavky, roztok byl promíchán vortexem. Vzniklý fialový komplex se měřil spektrofotometricky při 560 nm. Množství peroxidu vodíku bylo vypočteno z kalibrační křivky a přepočteno na gram suché půdy. Byly provedeny série měření s pěti různými extrakčními činidly (destilovaná voda, fosforečnanový pufr, aceton, methanol a methanol-voda 1:1) (obr. 4, str. 34), série měření s různou extrakční dobou (obr. 6, str. 38) a byla ověřena linearita metody (obr. 7, str. 39).

3.4.1.3 Stanovení peroxidu pomocí toluidinové modři

Do čtyř plastových centrifugačních kyvet o objemu 80 ml bylo naváženo 5,00 g lesní homogenizované půdy. Do každé kyvety bylo přidáno 18 ml destilované vody a 2 ml 2 mM EDTA. Vzorky byly extrahovány 15 min v ultrazvukové lázni a 15 min v ledové lázni. Po extrakci byla provedena centrifugace 15 min při 5000 otáčkách. Následně se k supernatantu přidal 1 ml 0, 2, 4, 6 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy jako standardní přídavek. Roztoky pro standardní přídavek peroxidu byly připraveny ředěním 30% roztoku peroxidu vodíku, jehož koncentrace byla ověřena jodometricky. Poté bylo pipetováno 15 ml supernatantu a k tomuto množství se přidal 1 ml 1M KI, 2 ml 50 mM HCl a po 10 minutách 1 ml 0,01% toluidinové modři, 2 ml 2 M octanu sodného. Barevná změna se proměřila spektrofotometricky při 630 nm. Na obrázku 8 (str. 39) je porovnání metody podle Wolffa a jodometrie.

3.4.2 Stanovení železa pomocí fenanthrolinu

Do plastové centrifugační kyvety bylo naváženo 5,00 g půdy a ta byla posléze extrahována 30 min 20 ml destilované vody a půda se od extrakčního roztoku oddělila

na centrifuze 15 min při 5000 otáčkách. Do 5 odměrných baněk se odpipetovalo 1, 3, 5, 7, 10 ml standardního roztoku Fe^{3+} o $c = 180 \mu\text{M}$ (připraveného z $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$). Do těchto baněk se přidaly 2 ml 10% $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 3 ml 0,1% 1,10 – fenanthrolinu a odměrné baňky byly doplněny po rysku 20% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Do další odměrné baňky bylo odpipetováno 10 ml ze získaného supernatantu s vyextrahovaným železem a baňka byla doplněna stejným způsobem jako předešlé. Dále byl připraven stejným způsobem jen bez analytu slepý vzorek. Množství železa bylo vypočteno z kalibrační křivky, bylo přepočteno ředění a výsledek je udán v tabulce 8 (str. 36) v $\mu\text{g Fe}$ na g suché půdy.

3.4.3 Stanovení TCA a abiotická chlorace

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 0,5 g huminových kyselin ke kterým se přidalo 0,3 ml DCP (vnitřní standard) o koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$, 0,5 g NaCl, 100, 50 a $0 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$, 50 mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ a 200 ml destilované vody. Směs se třepala 1 hodinu na třepačce s frekvencí kmitů 50Hz. Následně se kapalná fáze oddělí na centrifuze (15 min při 5000 otáčkách) a poté se supernatant ještě přefiltruje. Podle objemu získaného filtrátu se vypočetlo potřebné množství NaCl (0,4g NaCl na 6,5 ml filtrátu), který se ve vzorku rozpustil a dále se přidaly 2,5 ml koncentrované H_2SO_4 . Vzorek se následně přelil do dělicí baňky, kde se k němu ještě přidalo 30 ml diethyletheru a vzorek se nechal třepat na třepačce 20 minut, kdy došlo k vyextrahování TCA a DCP z vodné fáze do étherické. Po chvilce ustálení se oddělila vodná fáze od étherické. Po oddělení fází se étherická fáze ještě jednou centrifugovala 15 min při 5000 otáčkách, aby došlo k dokonalému oddělení etheru. Oddělená étherická fáze se vysušila Na_2SO_4 a odpařila se do sucha. K odparku se přidaly 2 ml diethyletheru a následně se odebralo 0,5 ml do tmavé reakční nádoby s těsněním a uzávěrem, ke kterým se přidalo 0,25 ml diazomethanu sloužícího jako derivatizační činidlo. Přidáním diazomethanu se TCA a DCP methylovali a potom se stanovovali ve formě methylesteru. Po 30 minutách od přidání diazomethanu se přidalo 0,25 ml toluenu. Nakonec bylo mikrodávkovacím odebráno $1 \mu\text{l}$ vzorku ve kterém se metodou GC-ECD stanovil poměr DCP/TCA. Na obrázcích 11-14 (str. 42-45) jsou chromatogramy ze stanovení standardů DCP a TCA, na obrázku 15 (str. 46) je kalibrační křivka a na obrázku 16 (str. 46) je výřez chromatogramu se stanovením TCA vzniklé abiotickou chlorací.

Parametry použitého chromatografu:

K GC-ECD analýze byl použit plynový chromatograf Varian 3400 s detektorem elektronového záchytu a split/splitless injektorem a počítačem s programem Star Chromatography Workstation 5.3. Jako nosný plyn bylo použito helium se vstupním tlakem 100 kPa, který odpovídal lineární průtokové rychlosti 25 cm/sec, a jako zhášecí plyn dusík (rychlost průtoku 30 ml/min). Byla použita kapilární kolona se slabě polární fází DB-5 (J&W, U.S.A.), která měla délku 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm a tloušťku filmu stacionární fáze 0,25 μ m.

Teplotní programy pro analýzu TCA:

- počáteční teplota byla 45°C udržovaná po dobu 0,8 min.
- následovalo prudké zvyšování teploty 25°C/min do 130°C, kde se setrvalo 4 min.
- opět byla zvýšena teplota na 290°C a to rychlostí 25°C/min, kde se setrvalo 10 min.
- teplota injektoru byla 200°C.
- teplota detektoru byla 290°C.

První minuta ve splitless módu, od 2. minuty ve split módu (podíl 1:50)

4. Výsledky a diskuse

4.1 Stanovení peroxidu

Tab. 3: Navážky bromičnanu, spotřeby standardizovaného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, jeho přesná koncentrace

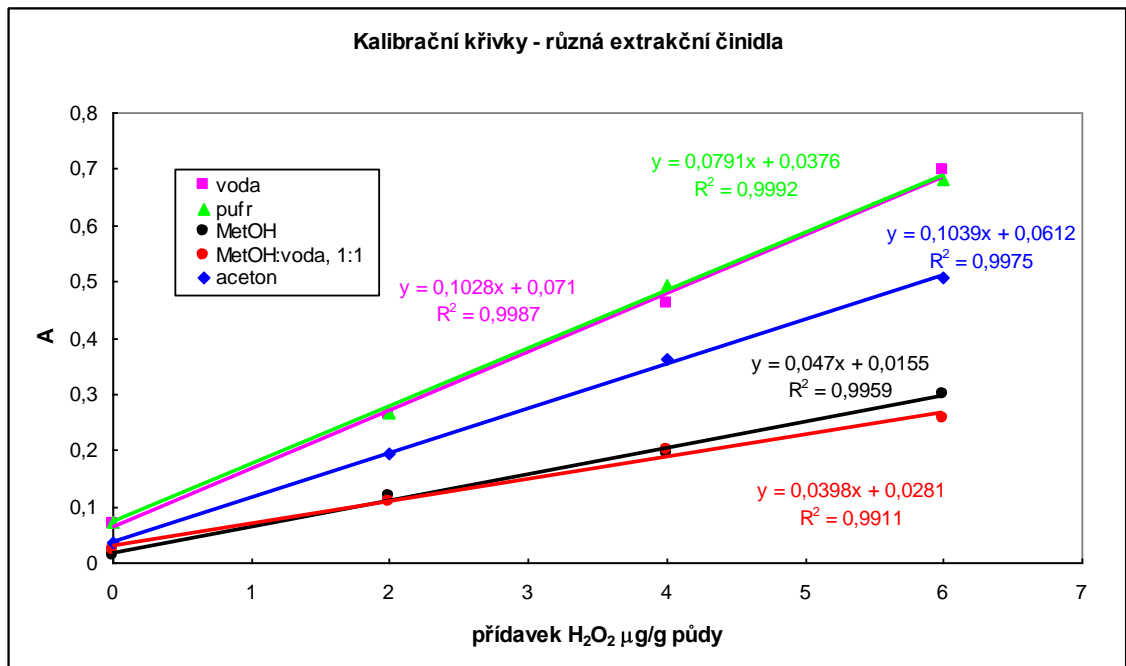
Navážka KBrO_3 g	Spotřeba $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mL	Koncentrace $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mol/L
0,0441	15,7	0,1009
0,0413	14,8	0,1003
0,0431	15,5	0,0999
Průměrná hodnota	15,33	0,1004

Koncentrace $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: $c = 0,1 \text{ M}$, $f = 0,0004$

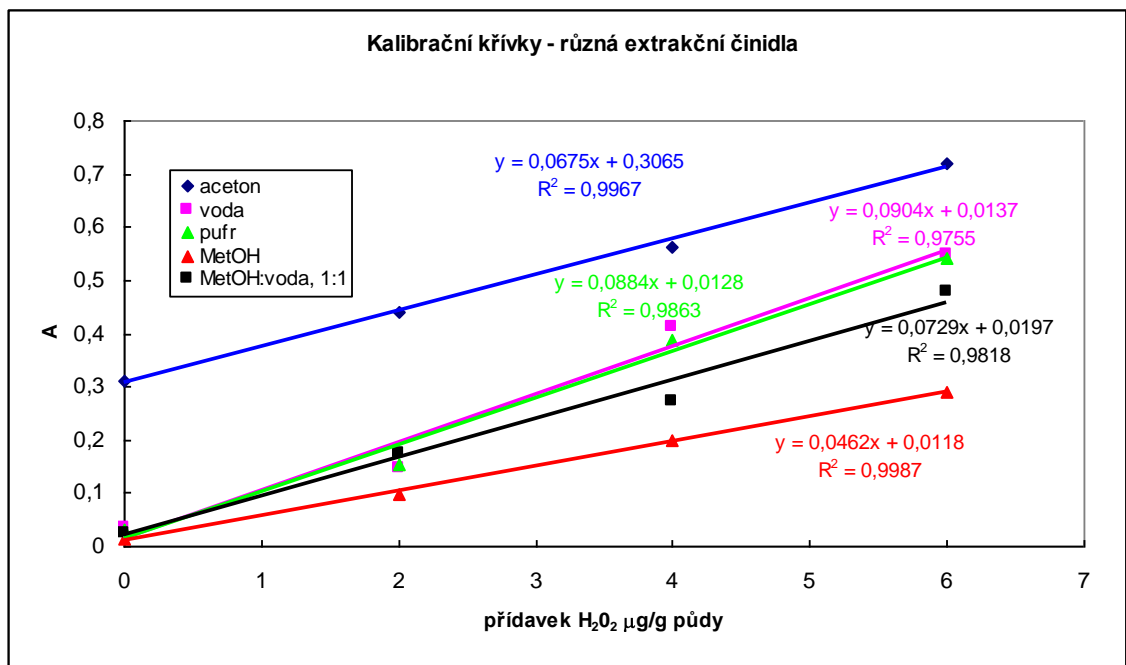
Tab. 4: Spotřeby thiosíranu a koncentrace H_2O_2

Spotřeba $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mL	Koncentrace H_2O_2 mol/L	w H_2O_2 %
11,7	7,8312	26,63
11,5	7,6973	26,17
11,9	7,9651	27,08
12,1	8,0989	27,54
Průměrná hodnota	7,8981	26,86

Koncentrace H_2O_2 : $w = 26,86\%$



Obr. 4 a): Stanovení peroxidu různými extrakčními činidly (stará půda) (Plhov 4 Fh 11.10. 2007)



Obr.4 b): Stanovení peroxidu různými extrakčními činidly (čerstvá půda) (Potok 12.3. 2009)

Metoda podle Wolffa je původně určena pro vodní vzorky, a proto se musela optimalizovat a pro extrakci peroxidu z půdy bylo vyzkoušeno pět různých činidel (destilovaná voda, fosforečnanový pufr o pH 7, methanol, methanol:voda v poměru 1:1, aceton). Na obrázcích 4 a) a b) je pro porovnání vidět pět kalibračních křivek všech použitých extrakčních činidel. Na grafu 4 a) jsou kalibrační křivky extrahované půdy z roku 2007 a jako nejlepší extrakční činidlo se ukázal fosforečnanový pufr a destilovaná voda. Ovšem na grafu 4 b) jsou ta samá extrakční činidla použita na čerstvou půdu a jako nejlepší extrakční činidlo se ukázal aceton. Vzorky byly extrahovány 15 min v ultrazvukové lázni a 15min byly chlazené v ledu, tedy celkem půl hodiny což byl předpokládaný dostatečný čas extrakce a stanovení peroxidu bylo provedeno metodou standardního přidavku.

Tab. 5: Stanovení reálných vzorků, extrakce vodou (rok 2007):

Lokalita	Množství peroxidu μg/g půdy (d.w.)	Průměr
Plhov 5Fh 11.10.2007	1,473	1,46
	1,391	
	1,522	
Plhov 4Fh 11.10.2007	1,083	1,19
	1,268	
	1,205	
Plhov 2Fh 10.10.2007	0,719	0,76
	0,823	
	0,751	
Nové Hrady Fh 6.6.2007	1,019	0,96
	0,852	
	1,002	
Jarošov 7Fh 6.6.2007	1,465	1,47
	1,568	
	1,380	
Jarošov 3Fh 10.10.2007	0,544	0,55
	0,547	
	0,554	
Jarošov 3Fh 6.6.2007	0,210	0,19
	0,189	
	0,174	

Tab. 6: Stanovení reálných vzorků, extrakce acetonem (rok 2007):

Lokalita	Množství peroxidu μg/g půdy (d.w.)	průměr
Plhov 5Fh 11.10.2007	1,256	0,96
	0,953	
	0,962	
Plhov 4Fh 11.10.2007	0,631	0,63
	0,550	
	0,695	
Nové Hradky Fh 6.6.2007	0,407	0,36
	0,325	
	0,355	

Tab. 7: Stanovení čerstvých vzorků, extrakce acetonem (rok 2009)

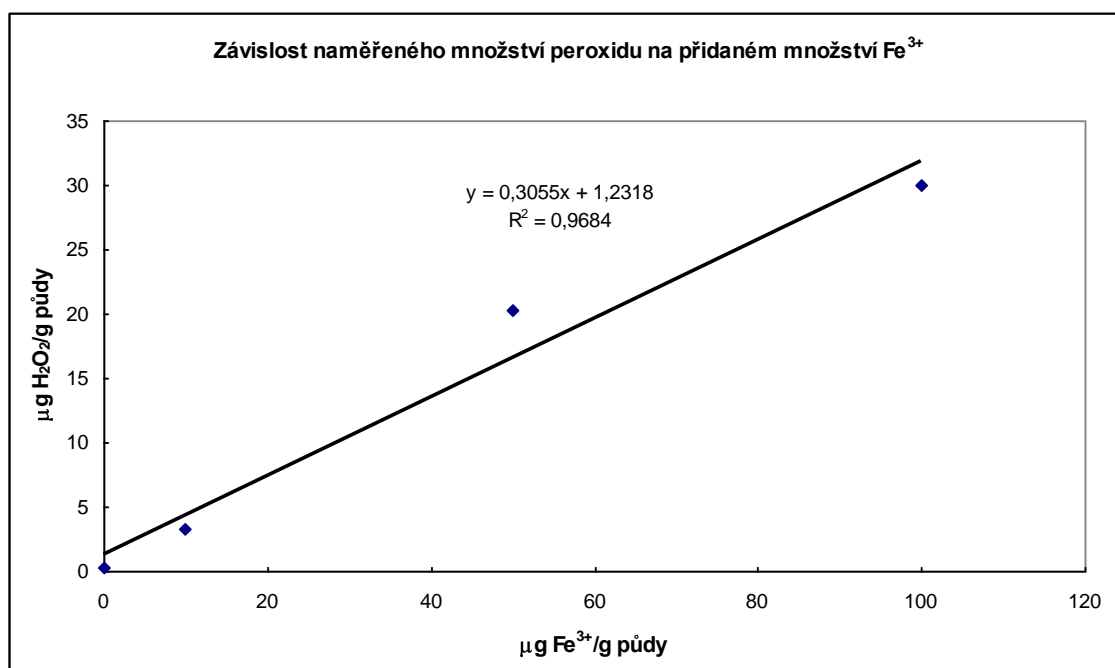
Lokalita	Množství peroxidu μg/g půdy (d.w.)	průměr
Vršek 12.3. 2009	2,60	2,65
	2,64	
	2,72	
Potok 12.3. 2009	2,44	2,43
	2,34	
	2,52	
Želivka	8,76	9,01
	9,02	
	9,24	

Tab. 8: Stanovení Fe čerstvých vzorků fenathrolinem, extrakce vodou

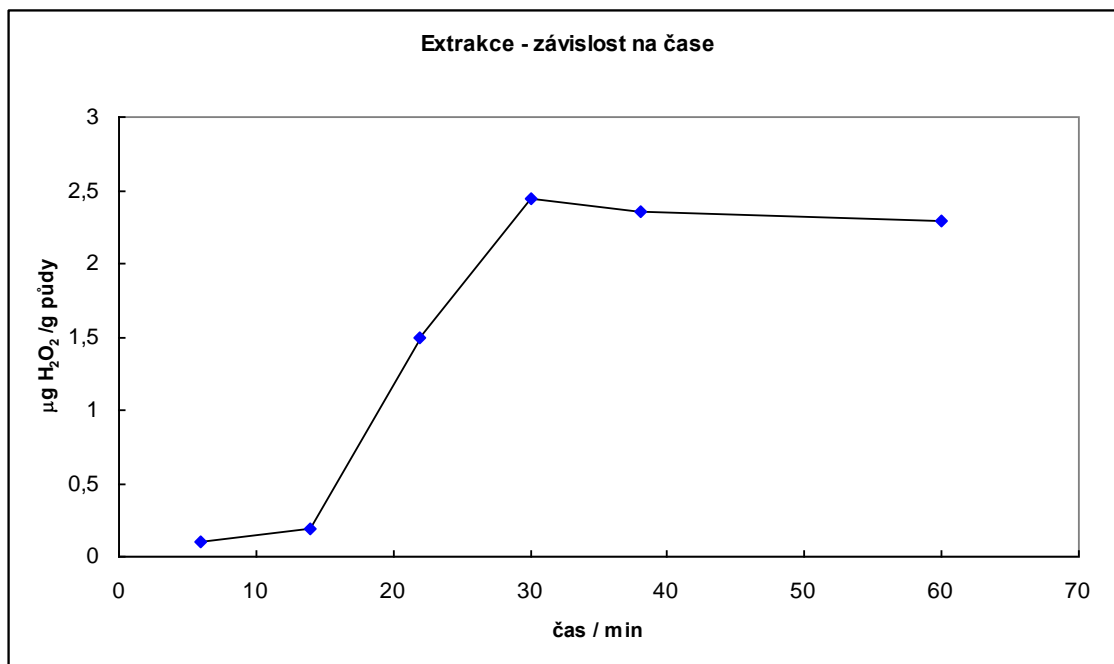
Lokalita	Množství Fe μg/g půdy (d.w.)
Vršek 12.3. 2009	7,19
Potok 12.3. 2009	4,20

V tabulce 5 jsou naměřená množství peroxidu ze vzorků půd z roku 2007 extrahovaných destilovanou vodou a v tabulce 6 vzorky z téhož roku extrahované acetonem. V tabulce 7 jsou čerstvé vzorky extrahované acetonem a porovnání výsledků napovědělo, že peroxid v dvouletých vzorcích byl již rozložený a možné vyextrahování

železa do vodných extraktů zkreslilo výsledek. Ve vodných roztocích se proto stanovil obsah železa pomocí fenathrolinu a ukázalo se, že i když jsou vodné extrakty kyselé (pH kolem 3-4), tak se extrahují nízká, ale přesto zásadní množství železa. Potenciální Fe^{2+} ionty způsobí rozklad peroxidu a Fe^{3+} ionty zase způsobí falešný výsledek. Obsah železa ve vodných extraktech čerstvých vzorků je v tabulce 8. Na grafu 5 je patrné, jak množství trojmocných iontů železa může zkreslit výsledek naměřeného peroxidu.

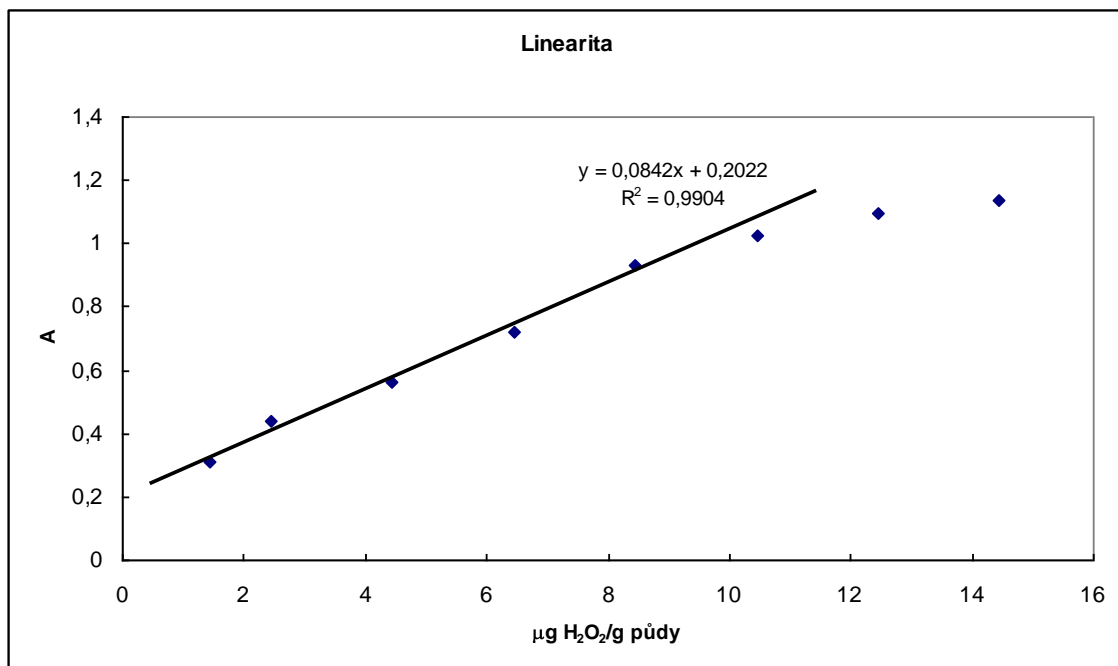


Obr. 5: Přidavky Fe^{3+} a falešné výsledky H_2O_2 (Nové Hradky Fh 10.10. 2007)

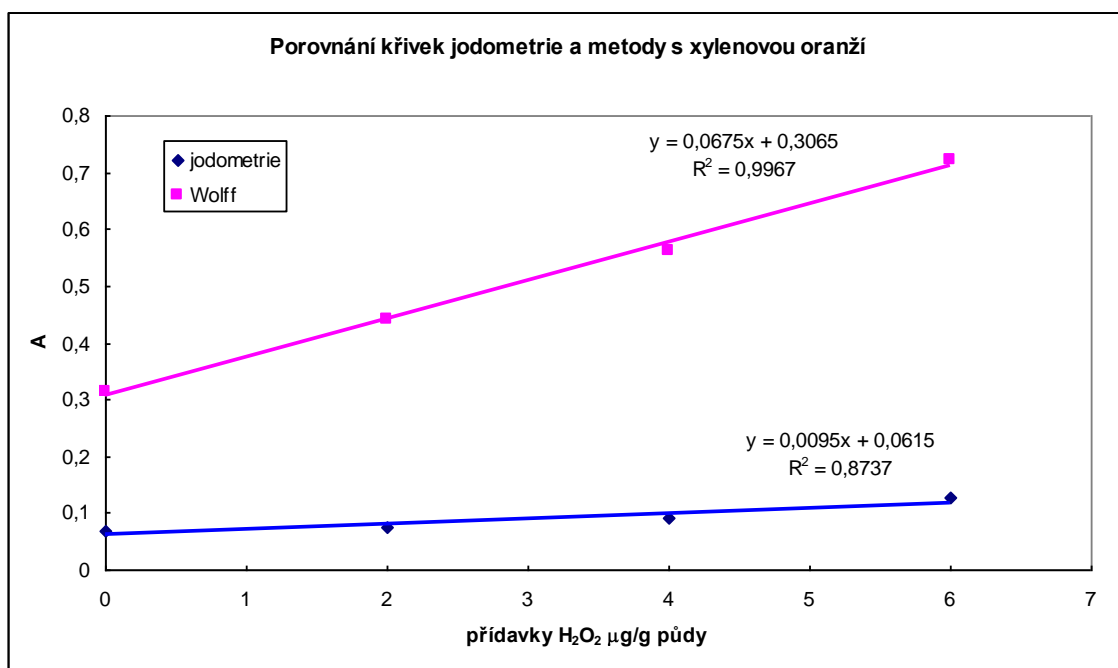


Obr. 6: Graf závislosti množství peroxidu na době extrakce

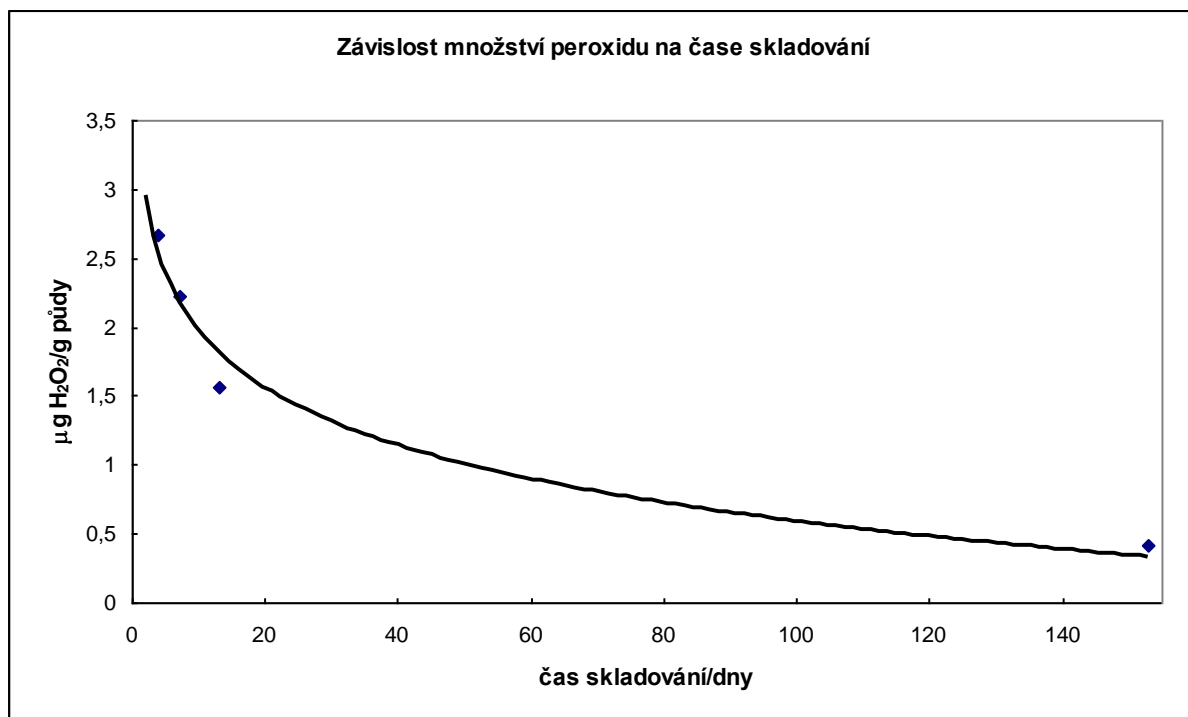
Na obrázku 6 je závislost vyextrahovaného množství peroxidu na čase. Vždy polovina z celkové doby extrakce byla v ultrazvuku a druhá polovina v ledové lázni. Vzorky se při extrakci chladily, aby se zabránilo rozložení peroxidu díky působení mikroorganismů. Z grafu je patrné, že předpokládaná doba extrakce 30 min je ideální. Na grafu 7 je ověření linearity metody. Při extrakci 5,00 g půdy 20 ml acetonu je metoda lineární do $10 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g půdy}$.



Obr. 7: Ověření linearity metody s xylenovou oranží



Obr. 8: Porovnání dvou metod – jodometrie s toluidinovou modří a metody používající xylenovou oranž



Obr. 9: Rozklad peroxidu ve skladovaném vzorku (Vršek 12.3. 2009)

Metoda stanovení hydroperoxidů pomocí Wolffa byla porovnána s jodometrickým stanovením pomocí toluidinové modři. Z grafu 8 vyplývá, že druhá metoda není dostatečně citlivá a není proto vhodná ke stanovení nízkých koncentrací peroxidů v půdě.

Na grafu 9 je vidět trend rozkládání peroxidů v půdě. Wolffovou metodou se nestanoví čistě jen peroxid vodíku, ale také další organické peroxidy např. butyl nebo kumyl hydroperoxidy. Peroxid vodíku se na základě různých vlastností půdy různou rychlostí rozkládá a i organické peroxidy, které jsou stabilnější, tomuto rozkladu podléhají, a proto se půda musí stanovovat pokud možno co nejčerstvější.

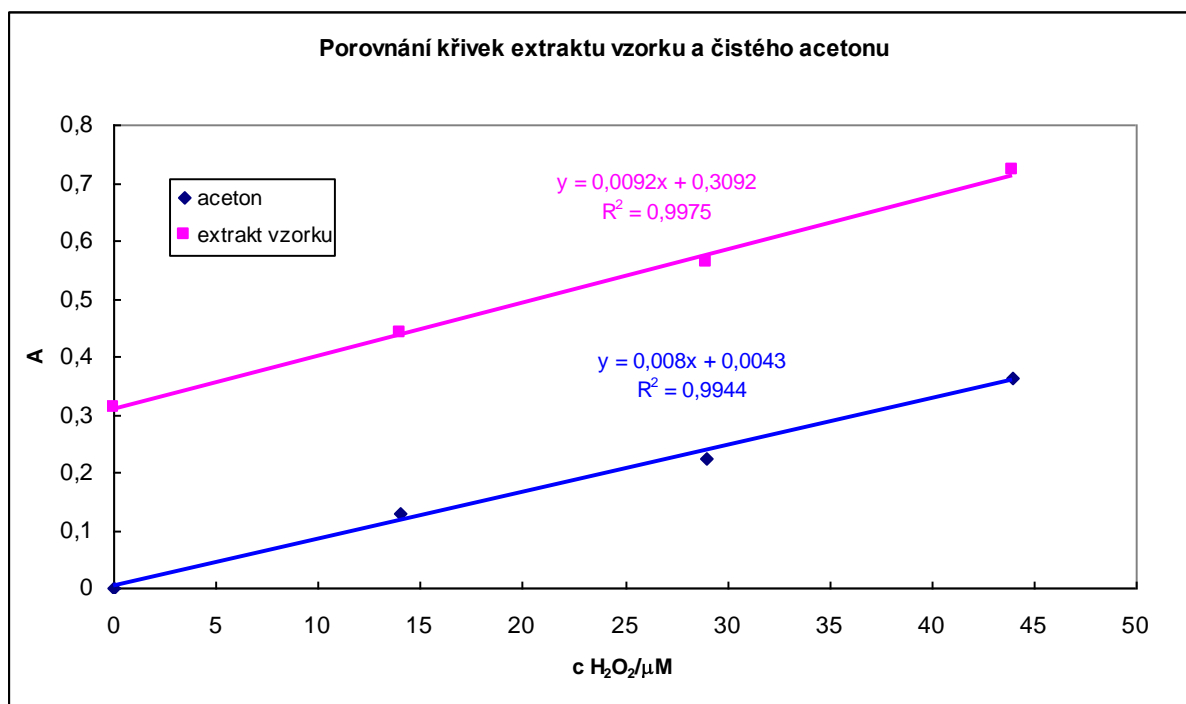
Výpočet meze detekce, stanovitelnosti a opakovatelnosti:

Limity detekce a kvantifikace byli vypočítány podle rovnic 33 a 34.

$$LOD = 3 \cdot \delta \quad (33)$$

$$LOQ = 7 \cdot \delta \quad (34)$$

Kde δ je šum ($0,098 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy) základní linie a byl vypočítán pomocí rovnice kalibrační křivky ($y = 0,008x + 0,0043$) viz graf 10 na kterém je porovnání přímek extraktu vzorku a kalibrační křivky s acetonem bez půdy. Absorbance matrice pro 8 měření jsou uvedena v tabulce 9.



Obr. 10: Kalibrační křivka vzorku půdy se standardním přídavkem a kalibrační křivka s čistým acetonem

Tab.9: Tabulka hodnot pro výpočet δ .

Číslo měření	A	Koncentrace H_2O_2 μM	Množství H_2O_2 $\mu\text{g/g}$ půdy (d.w.)
1	0,159	19,3375	2,6299
2	0,164	19,9625	2,7149
3	0,155	18,8375	2,5619
4	0,162	19,7125	2,6809
5	0,151	18,3375	2,4939
6	0,163	19,8375	2,6979
7	0,154	18,7125	2,5449
8	0,168	20,4625	2,7829
δ	0,005	0,7227	0,0982

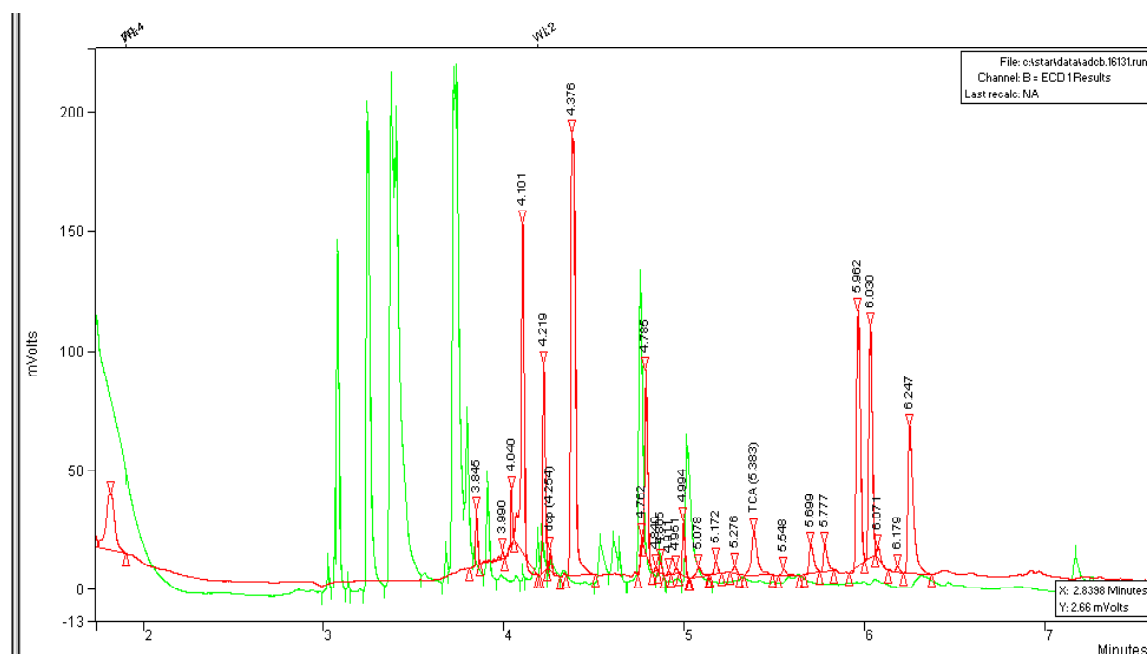
LOD = 0,29 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy (n=8)

LOQ = 0,69 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy (n=8)

Opakovatelnost byla stanovena pro 5 měření.

RSD = 9,4% (n=5)

4.2 Stanovení TCA



Obr. 11: Prvotní chromatogramy stanovení DCP + TCA

Pro stanovení TCA a DCP jako vnitřního standardu bylo nejprve nutno upravit separační podmínky a najít vhodné koncentrační rozpětí pro kalibraci. Na obrázku 11 jsou dva z prvních chromatogramů a v porovnání s obrázkem 12 (str. 44), kde je chromatogram TCA z plynového chromatografu s hmotnostním detektorem je vidět, že detektor elektronového záchytu je mnohem citlivější. Určit retenční časy obou stanovovaných látek nebylo snadné, protože na chromatogramu bylo množství píků pocházejících ze znečištění standardů a v případě snížení množství standardu se samozřejmě v odpovídajícím poměru snížilo i množství dalších látek. K určení retenčních časů standardů bylo tedy použito přímé porovnávání chromatogramů z GC-ECD a GC-MS stanovení, a to tak, že se použila stejná kolona (DB-5) a byl zvolen

stejný program GC. Píky hledaných látek byly určeny s velkou pravděpodobností na základě jejich hmotnostně charakteristických iontů.

Na obrázku 13 (str. 45) je chromatogram stanovení 30 ng DCP a 20 ng TCA, kde jsou obě látky označeny. Za udaných podmínek byla pomocí standardních roztoků TCA s odměřenými množstvími TCA 5, 10 a 20 ng získána lineární závislost (obr. 14 a 15, str. 45, 46). Množství vnitřního standardu DCP bylo vždy 30 ng.

Při pokusech vzniku TCA abiotickou chlorací nebylo možno vypočítat její množství, protože jí vzniklo málo a stanovení tedy bylo mimo kalibraci. Pokus byl prováděn 1 hodinu, což je krátká doba, ale i tak je z chromatogramu zřejmé, že při přidavku 100 μl H_2O_2 vzniklo více TCA než v případě s přidavkem 50 a 0 μl H_2O_2 (obr. 16, str. 46).

MS Data Review Active Chromatogram and Spectrum Plots - 23.7.2009 15:17

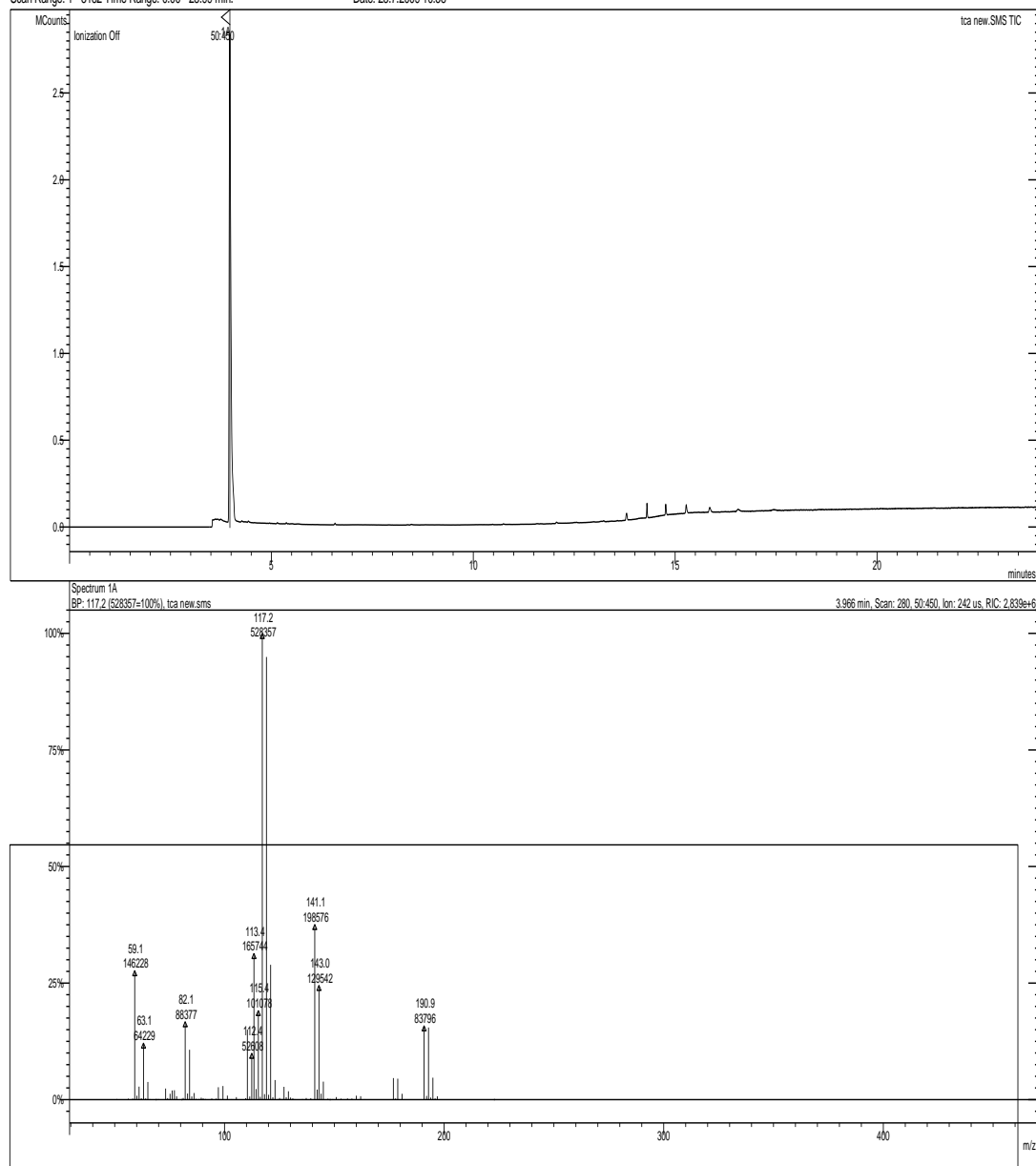
File: g:\sandoz\lca\tca new.sms

Sample: tca new

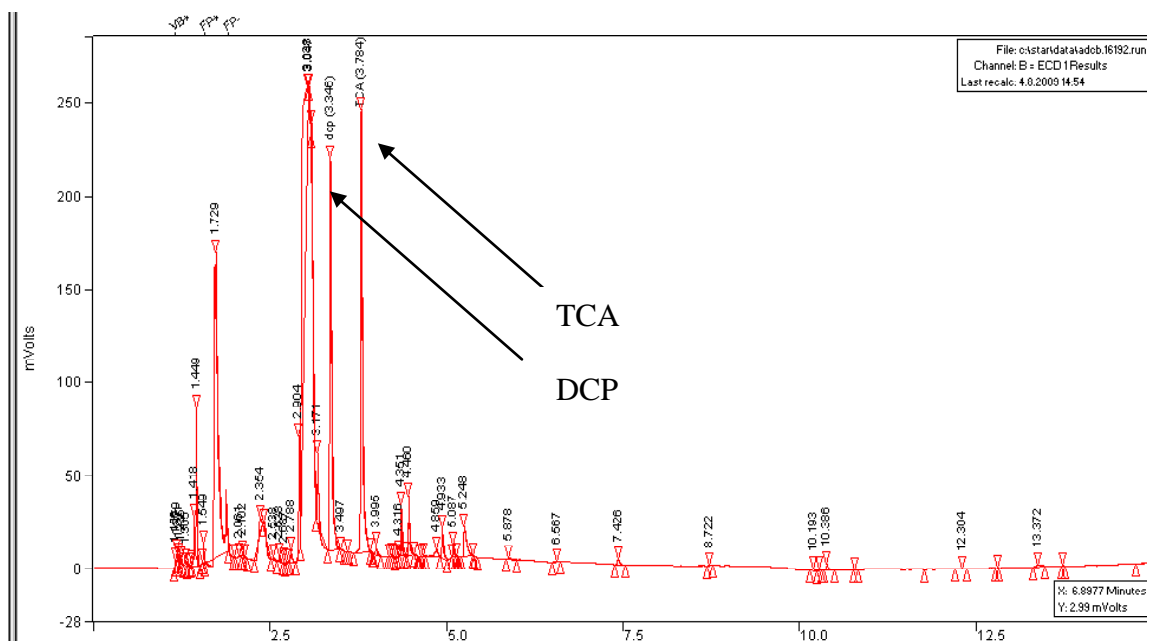
Scan Range: 1 - 3182 Time Range: 0.00 - 23.99 min.

Operator:

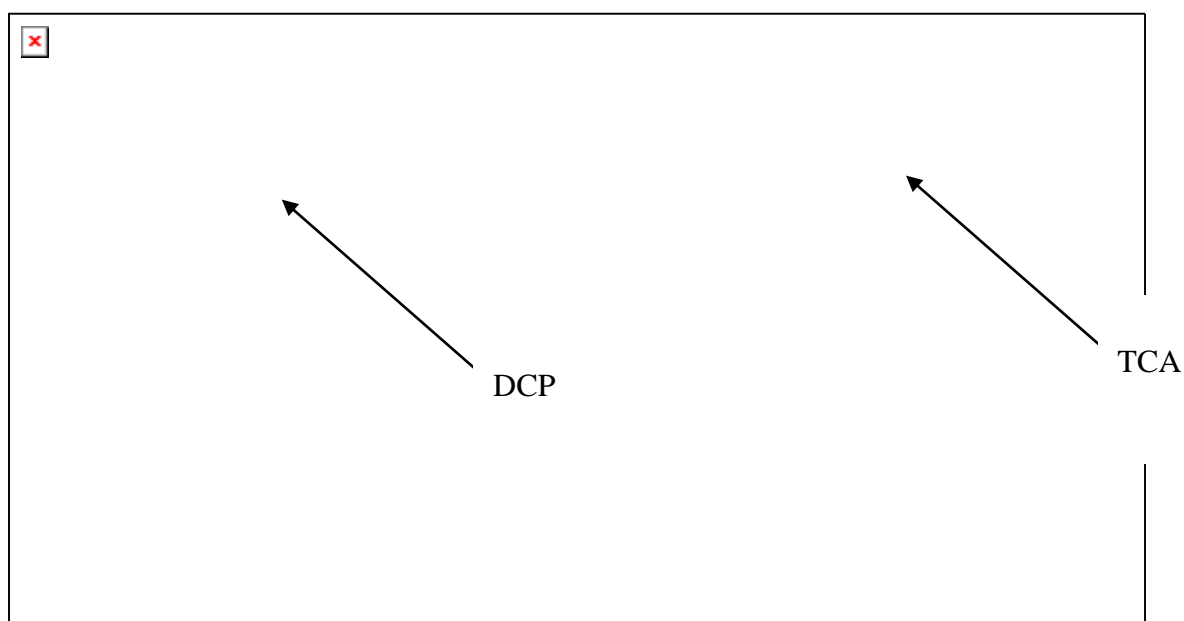
Date: 23.7.2009 10:58



Obr. 12: Chromatogram a hmotnostní spektrum methylesteru TCA



Obr. 13: Chromatogram 30 ng DCP + 20 ng TCA



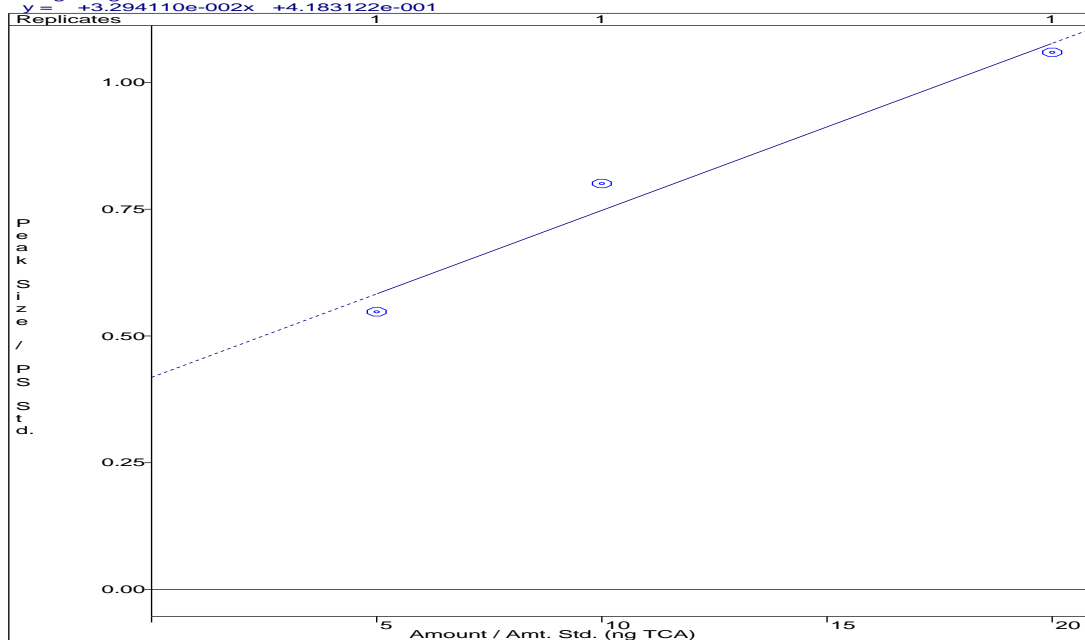
Obr. 14: Chromatamy kalibrace (30 ng DCP + 5, 10, 20 ng TCA)

Calibration Curve Report
 File: c:\star\startup1.mth
 Detector: ADC Board, Address: 16, Channel ID: B

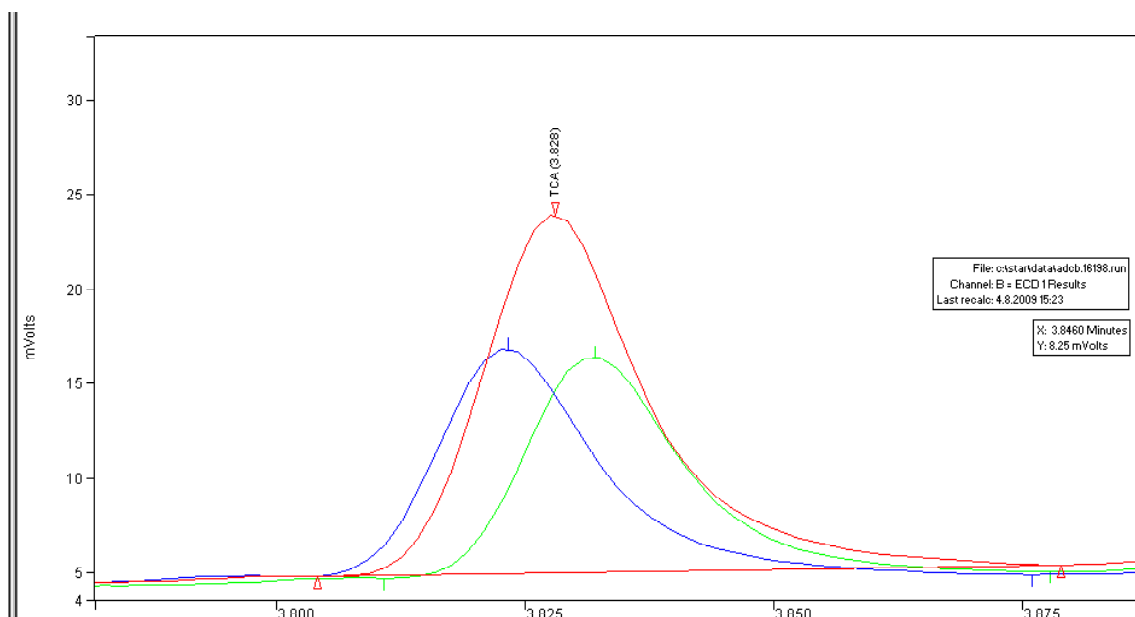
Internal Standard Analysis
 Curve Type: Linear
 Origin: Ignore
 $y = +3.294110e-002x + 4.183122e-001$

TCA

Resp. Fact. RSD: 34.98%
 Coeff. Det.(r²): 0.966590



Obr. 15: Kalibrační křivka



Obr. 16: Chromatogramy vzniklé TCA abiotickou chlorací

- 100 μl H₂O₂ (0,537 μg H₂O₂/g HA)
- 50 μl H₂O₂ (0,268 μg H₂O₂/g HA)
- 0 μl H₂O₂

5. Závěr

Peroxid vodíku v půdě produkuje řada různých půdních organismů. Jeho rozklad v půdě vede ke vzniku OH radikálů díky Fentonové reakci: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ a peroxid se tak v půdě právě přes vznikající hydroxylové radikály účastní abiotické chlorace organických látek. V půdě jsou přítomny chloridy, které jsou jednak z přirozených zdrojů a jednak z lidské činnosti jako je například solení pozemních komunikací během zimy a dále jsou v půdě samozřejmě přítomny různé organické látky. Organické látky podléhají chloraci díky reaktivnímu elementárnímu chloru, který může vznikat oxidací přítomných chloridů hydroxylovými radikály, které se vytvářejí při Fentonové reakci. Při této chloraci vznikají chlorované uhlovodíky s vyšší molekulovou hmotností a také těkavé chloroctové kyseliny jako např. TCA. Vzhledem k tomu, že je H_2O_2 běžnou součástí lesní půdy a jako oxidant má významný vliv na půdní chemii, je důležité znát jeho efektivní koncentraci. Pro stanovení peroxidu lze užít řady analytických metod a stanovuje se v různých matric. Cílem této práce byla optimalizace nenáročné spektrofotometrické metody za použití xylenové oranže ke stanovení efektivního množství hydroperoxidů v lesní půdě.

Metoda s použitím xylenové oranže je založena na selektivní reakci vyextrahovaných peroxidů s dvojmocným železem v činidle. Vzhledem k tomu, že půda je složitá matrice, a že může obsahovat velké množství železa tvořící vysoké pozadí byla zvolena metoda standardního přídavku. Dále bylo potřeba nalézt vhodné extrakční činidlo. Ukázalo se, že vodné extrakty nejsou příliš vhodné, protože výsledek zkresluje železo, které se i při kyselém pH z půd extrahuje. Pro extrakci peroxidů z půdy je vhodný aceton.

Dalšími optimalizačními kroky bylo zjištění limitů detekce, kvantifikace, opakovatelnost měření a linearita. Mez detekce je $0,29 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy ($n=8$), mez stanovitelnosti je $0,69 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy ($n=8$) a $\text{RSD} = 9,4\%$ ($n=5$). Metoda je při extrakci $5,00 \text{ g}$ půdy 20 ml acetonu lineární do hodnot $10 \mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy.

Na konec bylo provedeno ještě stanovení H_2O_2 jodometricky pomocí toluidinové modři a bylo porovnáno s metodou využívající xylenovou oranž. Jodometrické metoda se jeví jako velmi necitlivá a tudíž ke stanovení peroxidu v půdě nevhodná.

Množství peroxidu v čerstvých jarních vzorcích půdy se pohybovalo od 2,5 do 9 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g}$ půdy, tedy bylo naměřeno více než v nečerstvých vzorcích. Peroxid vodíku se v závislosti na své koncentraci a vlastnostech půdy různou rychlostí rozkládá a stejně tak i stabilnější organické peroxidy, proto bylo důležité i zjištění doby skladovatelnosti vzorků. Z měření vyplývá, že rozklad peroxidů je v humusových horizontech ze kterých jsou půdní vzorky odebírány velmi rychlý a vhodné je stanovit co nejčerstvější půdu.

Při pokusech vzniku TCA abioticky bylo použito nadměrně peroxidu vodíku (53,72 a 26,86 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g HA}$) a chlorace probíhala jednu hodinu. Výsledné naměřené množství TCA bylo příliš nízké a tudíž mimo kalibraci. Nicméně z chromatogramů vyplývá, že při přidavku většího množství peroxidu vzniklo více TCA. K přesnému stanovení míry tvorby TCA by bylo potřeba vzorky více zakoncentrovat, a také provést delší inkubační dobu pokusu.

6. Použitá literatura

- Asplund, G., Grimvall, A. 1991. Organohalogens in nature. More widespread than previously assumed. *Environmental Science and Technology* 25:1347–1350
- Cooper, W. J., Saltzman, E. S., Zika, R. G. 1987. The contribution of rainwater to variability in surface ocean hydrogen peroxide. *Journal of Geophysical Research* 92:2970-2980
- Enoki, A., Itakura, S., Tanaka, H. 1997. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. *Journal of Biotechnology* 53:265-272
- Fahimi, I. J., Keppler, F., Schöler, H. F. 2003. Formation of chloroacetic acids from soil, humic acid and phenolic moieties. *Chemosphere* 52:513–520
- Forczek, S. T. 2005. Secondary Atmospheric Pollutants and Forest Decline: Uptake, Effect and Fate of Trichloroacetic Acid in Norway Spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). Thesis, Faculty of Science, Dept. Plant Physiology, Charles University, Prague.
- Frank, H., Scholl, H., Renschen, D., Rether, B., Norokorpi, Y. 1994. Haloacetic acids, phytotoxic secondary air pollutants. *Environmental Science and Pollution Research* 1:4-14
- Haiber, G., Jacob, G., Niedan, V., Nkusi, G., Schöler, H. F. 1996. The occurrence of trichloro acetic acid (TCAA) – indications of a natural production? *Chemosphere* 33:839-849
- Hellpointner, E., Gab, S. 1989. Detection of methyl, hydroxymethyl and hydroxyethyl hydroperoxides in air and precipitation. *Nature* 337:631-634
- Hoekstra, E. J. 2003. Review of concentrations and chemistry of trichloroacetate in the environment. *Chemosphere* 52:355-369
- Hua, W., Chen, Z. M., Jie, C. Y., Kondo Y., Hofzumahaus A., Takegawa, N., Lu, K. D., Miyazaki Y., Kita K., Wang H. L., Zhang, Y. H., Hu M. 2008. Atmospheric hydrogen peroxide and organic hydroperoxides during PRIDE-PRD'06, China: their concentration, formation mechanism and contribution to secondary aerosols. *Atmospheric Chemistry and Physics Journal* 8:10481-10530
- Jensen, K. A., Houtman, C. J., Ryan, Z. C., Hammel, K. E. 2001. Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2705-2711.

- Juuti, S., Norokopi, Y., Ruuskanen, J. 1995. Trichloroacetic acid (TCA) in pine needles caused by atmospheric emissions of kraft pulp mills. *Chemosphere* 30:439–448
- Kenneth, E., Hammel, A., Kapich, N., Kenneth, A., Jensen, J., Zachary, C. 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30:445-453
- Klouda P. *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda 1996, 102-103
- Koenigs, J. W. 1974. Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. *Archives Of Microbiology* 99:129-145.
- Kontchou, C. Y., Blondeau, R. 1990. Isolation and characterization of hydrogen peroxide producing *Aerococcus* sp. from soil samples. *Microbiology Letters* 68:323-327
- Laturnus, F., Fahimi, I., Gryndler, M., Hartmann, A., Heal, M. R., Matucha, M., Schöler, H. F., Schroll, R. 2005. Natural formation and degradation of chloroacetic acid and volatile organochlorines in forest soil. *Environmental Science and Pollution Research* 12:233-244
- Matucha, M., Uhlířová, H., Fuksová, K., Forczek, S. T. 2000. Halogenderiváty C₂-uhlovodíků a poškození lesa: Účinek kyseliny trichloroctové na smrk ztepilý. *Chemické Listy* 94:822-843
- Matucha, M., Forczek, S. T., Gryndler, M., Uhlířová, H., Fuksová, K., Schröder, P. 2003. Trichloroacetic Acid in Norway Spruce/Soil-System I. Biodegradation in Soil. *Chemosphere* 50:303-309.
- McCulloch, A. 2002. Trichloroacetic acid in the environment. *Chemosphere* 47:667-686
- Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P. *Spektrometrické analytické metody I*, nakladatelství Karolinum, Praha 2004, (ISBN 80-246-0776-X)
- Norokorpi, Y., Frank, H. 1995. Trichloroacetic acid as a phytotoxic air pollutant and the dose-response relationship for defoliation of Scots pine. *Science of the Total Environment* 160/161:459-463
- Öberg, G. 2002. The natural chlorine cycle – fitting the scattered pieces. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58:565-581
- Öberg, G. 1998. Chloride and organic chlorine in soil. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 26:137-144

- Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha 2003, (ISBN 80-246-0553-8)
- Padilla, H., Torres, M. C., Bélmont, R., García, R., Báez, A. 2007. Total peroxides and sulfate in rainwater in the Mexican eastern Pacific Ocean during the Climatic Experiment in the Americas Warm Waters Pool. *Atmósfera* 20:299-305
- Pena, R. M., Garcia, S., Herrero, C., Lucas, T. 2001. Measurements and analysis of hydrogen peroxide rainwater levels in a Northwest region of Spain. *Atmospheric Environmental* 35:209-219
- Petigara, R., Blough, N. V., Mignerey, A. C. 2002. Mechanisms of Hydrogen Peroxide Decomposition in Soils. *Environmental Science and Technology* 36:639-645
- Ravikumar, J. X., Gurol, M. D. 1994. Chemical oxidation of Chlorinated Organics by Hydrogen peroxide in the Presence of Sand. *Environmental Science and Technology* 25:394-400
- Rodstedth, M., Stahlberg, C., Sandén, P., Öberg, G. 2003. Chloride imbalances in soil lysimeters. *Chemosphere* 52:381–389
- Salzer, P., Boller, T. 1999. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208:319-325
- Sauer, F., Limbach, S., and Moortgat, G. K. 1997. Measurements of hydrogen peroxide and individual organic peroxides in the marine troposphere, *Atmospheric Environmental* 31:1173–1184
- Schachl, K., Alemu H., Kalcher K., Ježková J., Švancara I., Vytřas K. 1997. Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide With a Manganese Dioxide-modified Carbon Paste Electrode Using Flow Injection Analysis. *Analyst* 122:985
- Schöler, H. F., Keppler, F., Fahimi, I. J., Niedan, V. W. 2003. Fluxes of trichloroacetic acid between atmosphere, biota, soil, and groundwater. *Chemosphere* 52:339–354
- Sunil, K., Narayana, B. 2008. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81:422-426
- Svensson, T., Sandén, P., Bastviken, D., Öberg, G. 2007. Chlorine transport in a small catchment in southeast Sweden during two years. *Biogeochemistry* 82:181-199
- Šrámek V., Kosina L. *Analytická chemie*, FIN, Olomouc 1996,(ISBN 80-7182-005-9)

- Tanaka, H., Itakura, S. and Enoki, A. 1999. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-mass substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* 75:57-70
- Tornberg, K., Olsson, S. 2002. Detection of hydroxyl radicals produced by wood-decomposing fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 40: 13-20
- Uhlířová, H., Matucha, M., Forczek, S. T. 2002. Účinky chloroctových kyselin na smrk ztepilý (*Picea albies*/L./Karst). *Zprávy lesnického výzkumu* 47:16-20
- Winterton, N. 2000. Chlorine: the only green element - towards a wider acceptance of its role in natural cycles. *Green Chemistry* 2:173-225.
- Wolff, S. P. 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology* 233:182-189.